UNIVERSITE MARIEN NGOUABI
FACULTE DES SCIENCES

Année:2006-2007 N° d'ordre:

Formation Doctorale: Valorisation des Plantes Aromatiques et Médicinales
Option: Activités Biologiques et Biotechnologies

MEMOIRE

Pour l'obtention du Diplôme d'Etudes Approfondies

Présenté et soutenu publiquement le 22 décembre 2007

par

NKOUA BADZI Cynthia

Maître ès Sciences

Etude des Effets de *Trema orientalis* Linn. sur le Paludisme Simple à *Plasmodium falciparum*

DIRECTEUR DE MEMOIRE
ABENA Ange Antoine,
Professeur à l'Université Marien NGOUABI

JURY

Président: EKOUYA Alphonse, Professeur à l'Université Marien NGOUABI

Membres: ABENA Ange Antoine, Professeur à l'Université Marien NGOUABI

OBENGUI, Maître de Conférences agrégé à l'Université Marien NGOUABI

BELO Maurice, Professeur à l'Université Marien NGOUABI

DEDICACE

Je dédie ce document

A mon défunt et bien aimé père Pierre Félicien NKOUA

A ma bien aimée mère Emilienne KOLI

A mes frères et sœurs chéris ainsi qu'à l'ensemble de ma famille.

A mes amis qui ont toujours été présents pour moi en me soutenant et me redonnant force et courage au cours des différentes étapes traversées.

REMERCIEMENTS

Mes sincères remerciements

Au Professeur Ange Antoine ABENA enseignant à l'Université Marien NGOUABI pour avoir bien voulu m'encadrer et pour ses directives.

Au Professeur EKOUYA Alphonse, enseignant à l'Université Marien NGOUABI pour avoir bien voulu présider le Jury de ce mémoire de DEA.

Au Professeur OBENGUI, enseignant à l'Université Marien NGOUABI pour avoir bien voulu examiner ce mémoire de DEA.

Au Professeur BELO Maurice, enseignant à l'Université Marien NGOUABI pour avoir bien voulu examiner ce mémoire de DEA.

Au Docteur Jean-Vivien MOMBOULI, Directeur de la Recherche et de la Production au Laboratoire National de Santé Publique et enseignant à l'Université Marien NGOUABI non seulement pour avoir voulu m'encadrer mais surtout pour ses conseils et sa précieuse aide.

Au Professeur Henri-Joseph PARRA, Directeur Général du Laboratoire National de Santé Publique et enseignant à l'Université Marien NGOUABI pour m'avoir chaleureusement accueillie dans son établissement et pour ses conseils.

Au Docteur Etienne MOKONDJIMOBE, Directeur Biomédical au Laboratoire National de Santé Publique et enseignant à l'Université Marien NGOUABI pour avoir accepté que je puisse analyser mes échantillons dans son département, pour son don en quelques réactifs et pour ses conseils.

A Monsieur Auguste NZOUGANI, phytothérapeute pour sa collaboration et son apprentissage tout au long de ce travail.

Aux responsables du Centre de Soins Intégrés de l’Armée du Salut de Moungali pour m’avoir chaleureusement accueilli et permis de réaliser cette étude.

Au Docteur Antoine OUABONZI, Directeur du Centre d'Etudes sur les Ressources Végétales pour m’avoir chaleureusement accueillie dans son établissement.

Au Docteur Mathieu NDOUNGA, chef du laboratoire de Pharmacologie au Centre d'Etudes sur les Ressources Végétales pour son aide et sa participation dans ce travail.

A Madame Dorothée SIANARD pour son aide lors du screening phytochimique et pour ses astuces.

Au Docteur Benjamin ATIPO, à Madame Julienne KAKOU et Monsieur Charles MBEDI respectivement chefs des services de Parasitologie, d’Hématologie et de Biochimie au Laboratoire National de Santé Publique ainsi qu’à leurs techniciens pour leur précieuse aide et leur disponibilité.

Aux Docteurs Louis Régis DOSSOU-YOVO pour ses astuces et son aide dans le traitement des données, Marie-Yvonne NDOUNDOU NKODIA chef de service de Virologie, Rock Fabien NIAMA, Jean AKIANA et Nicolas MBONGO chef de service de Maladies Parasitaires et de Valorisation des Plantes Médicinales pour leurs conseils et aux techniciens de la Direction de la Recherche et de la Production pour leur gentillesse et leur disponibilité.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ALAT	Alanine Amino Transférase
ASAT	Aspartate Amino Transférase
CSA	Chondroitine-4-Sulfate A
CSI	Centre de Soins Intégrés
CSP	Circumsporozoïte
DCI	Dénomination Commune Internationale
EDTA	Acide Ethylène-Diamino-Tetra-Acétique
DEA	Diplôme d’Etudes Approfondies
$FeCl_3$	Chlorure de Fer
GPI	Glycosylphosphatidyl Inositol
HCl	Acide Chlorhydrique
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1
LDH	Lactodéshydrogénase
NO	Monoxyde d’azote
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ORL	Oto-Rhino-Laryngologie
PECAM-1	Platelet/endothelial cell adhesion molecule 1
PfEMP-1	Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein-1
TGO	Transaminase Glutamino-Oxaloacétique
TGP	Transaminase Glutamino-Pyruvique
TLR	Toll Like Receptor
TNFα	Tumor Necrosis Factor α
VCAM	Vascular endothelial Cell Adhesion Molecule

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURES

TABLEAUX

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION ET POSITION DU PROBLEME

La République du Congo est située en Afrique centrale. Sa superficie est de 342.000 Km^2 avec une population estimée en 2005 à 3.570.000 habitants et une densité de 6 habitants/Km^2. La couverture des besoins sanitaires des populations est très faible, y compris pour la prise en charge du paludisme. Ainsi, en 2002 par exemple, le paludisme représentait 54% des motifs de consultation dans la population générale [1, 2, 3].

Le paludisme est une infestation parasitaire due à des protozoaires du genre Plasmodium. Il existe quatre espèces de Plasmodium susceptibles d'infester l'homme: malariae, vivax, ovale et falciparum. Seule la dernière espèce est responsable de la mortalité associée au paludisme. Au Congo, la quasi-totalité des cas de paludisme implique *Plasmodium falciparum*.

Plasmodium falciparum est un protozoaire tellement mutagène qu'il développe inéluctablement des résistances aux différentes molécules antipaludiques [4].

Cette mutagénicité a une incidence négative sur la capacité des patients à se traiter, car les nouveaux médicaments sont trop onéreux pour le pouvoir d'achat de la majorité des Africains. Ainsi, pour soigner cette maladie dont l'étendue et la sévérité sont étroitement associées à la pauvreté [5], les congolais ont, semble t-il, recourt aux plantes médicinales.

En république du Congo, une stratégie de promotion des plantes médicinales existe depuis 1986. Le développement de la médecine traditionnelle pourrait donc faire partie intégrante de la lutte contre la pauvreté et participer au processus de développement durable. Cependant, il est important de valider par des méthodes scientifiques la prise en charge du paludisme par les tradithérapeutes qui ont recours aux plantes médicinales.

Ainsi, le premier objectif du présent travail est de développer une démarche scientifique, de collaboration avec les tradithérapeutes, qui permettra d'établir une base de données consignant les effets curatifs, thérapeutiques et/ou toxiques des plantes médicinales réputées antipaludiques.

Une telle base de données pourra à la longue (i) constituer une pharmacopée, (ii) permettre d'orienter des travaux de recherche fondamentale et (iii) renforcer les connaissances aussi bien des autorités que des utilisateurs.

Parmi les nombreuses plantes réputées antipaludiques, *Trema orientalis (*Synonyme : *Trema guineensis)* bénéficie d'une large distribution géographique dans l'ensemble des pays de l'hinterland du Golfe de Guinée, y compris en République du Congo. En cas d'efficacité antipaludique avérée et en l'absence de toxicité démontrée, la grande disponibilité de *Trema orientalis* revêtirait donc un

intérêt stratégique dans la lutte contre la pauvreté en permettant le développement de phytomédicaments antipaludiques à faible coût.

Le deuxième objectif de ce travail est donc d'évaluer l'action antipaludique de *Trema orientalis.*

L'évaluation « clinique » auprès du tradithérapeute se réalisera à la fois sur la base symptomatique et sur quelques indicateurs biomédicaux du paludisme à savoir la parasitémie, la fièvre, la tension artérielle, le taux d'hémoglobine, la transaminasémie, la créatininémie et la glycémie.

Cette évaluation « clinique » primaire se poursuivra par l'étude des effets *in vitro* de *Trema orientalis* sur les cultures de *Plasmodium falciparum,* d'une part, et sur la réactivité des plaquettes isolées, d'autre part.

CHAPITRE I : GENERALITES

I. *Contexte général et justification*

La description de pathologies semblables au paludisme remonte à plus de 3000 ans avant notre ère. Aujourd'hui, 40% de la population mondiale habitent dans les zones à risque qui concernent essentiellement les régions tropicales et subtropicales. Le Congo, du fait de sa position géographique, se trouve au coeur de la région endémique du paludisme.

Il y aurait plus de 300 millions de cas de maladie aiguë chaque année et au moins un million de décès dus au paludisme à travers le monde. Soulignons que la morbidité et la mortalité dues à cette maladie touchent surtout les enfants et les femmes enceintes. Ainsi, plus de 75 % des victimes sont des enfants africains de moins de 5 ans [6, 7].

Bien qu'il existe plusieurs molécules antipaludiques, la lutte contre le paludisme doit surmonter l'apparition de souches de *Plasmodium falciparum* de plus en plus résistantes aux spécialités pharmaceutiques qui sont disponibles, d'une part, et le prix onéreux de ces molécules, d'autre part. Du fait de leur faible revenu, la majorité des congolais se rabat soit sur les médicaments vendus dans la rue, dont la qualité laisse à désirer à cause entre autres des conditions de conservation, soit sur les traitements traditionnels, dont l'efficacité reste à démontrer sur des bases objectives.

Des enquêtes ethnobotaniques réalisées à Brazzaville [8] et dans d'autres régions du pays [9] rapportent l'existence d'une multitude de plantes médicinales à vertu antipaludique. Ainsi, combattre le paludisme à partir des plantes médicinales représente un challenge qui est à portée de main.

Trema orientalis est une plante médicinale utilisée par les tradithérapeutes Congolais et Africains contre diverses maladies métaboliques, neurologiques et infectieuses y compris le paludisme [9, 10].

Dans un contexte de transmission intense du paludisme et de non disponibilité des outils de diagnostic, les tradithérapeutes assimilent de manière présomptive les accès fébriles à des épisodes palustres. Au regard de la liste impressionnante de maladies infectieuses, qui au Congo et en Afrique, se manifestent par des accès fébriles, il importe de vérifier les vertus antipaludiques de *Trema orientalis*.

II. Biologie de Plasmodium falciparum

1. Position systématique

Règne des **Protistes**

Embranchement des **Apicomplexa**

Classe des **Haemosporidea**

Ordre des **Haemosporida**

Famille des **Plasmodidae**

Genre **Plasmodium**

Espèce **falciparum**

2. Cycle de développement du parasite

Plasmodium falciparum est un hématozoaire avec un cycle de développement biologique qui comprend trois phases de multiplication dont deux, les multiplications hépatique et érythrocytaire, se déroulent chez l'homme alors que la troisième, la multiplication sexuée débute chez l'homme et se termine chez l'anophèle (figure 1) [11].

2.1 Cycle hépatique

Au moment de la piqûre d'anophèle femelle, les sporozoïtes contenus dans les glandes salivaires sont injectés dans la microcirculation du tissu sous-cutané. Ils peuvent survivre au plus 45 minutes dans le sang avant d'atteindre le foie et coloniser les cellules hépatiques [12]. L'invasion des cellules hépatiques fait suite à l'interaction spécifique entre la protéine majeure de surface du sporozoïte (CSP) et un récepteur spécifique situé sur la membrane plasmique de l'hépatocyte du côté de l'espace de Disse (un compartiment interstitiel hépatique facilement accessible à partir du compartiment sanguin) [12].

Le sporozoïte entre ensuite dans une phase de réplication au sein de la vacuole parasitophore pour former des mérozoïtes (figure 2). A maturation, les mérozoïtes sont ensuite libérés et gagnent le sang à travers les capillaires sinusoïdaux du foie.

2.2 Cycle Erythrocytaire

2.2.1. *Colonisation des globules rouges*

Les mérozoïtes libérés du foie passent dans le sang pour parasiter les globules rouges. Un globule rouge ne peut être infecté que par un mérozoïte à la fois. Le mérozoïte possède de

nombreuses protéines de surface qui adhèrent à la surface du globule rouge grâce à une liaison ligand-récepteur [12]. A l'apex du mérozoïte se trouvent plusieurs organites intracellulaires : micronèmes, granules denses et rhoptries qui contiennent toutes les molécules protéiques et lipidiques indispensables au déroulement de l'invasion du globule rouge (figure 2). A la suite du contact initial, le mérozoïte se réoriente afin que son pôle apical soit au contact de la membrane plasmique du globule rouge [12].

A ce moment, il s'établit une jonction serrée entre le mérozoïte et l'érythrocyte. Puis, un processus de signalisation intra-parasitaire encore inconnu déclenche le déversement par exocytose du contenu des rhoptries et des micronèmes d'invasion de l'érythrocyte. Ce contenu permet d'abord la formation d'une vacuole parasitophore dans la lumière de la jonction serrée. Ensuite, la jonction serrée entre le parasite et le globule rouge semble se déplacer de part et d'autre du point initial d'interaction, entraînant l'engloutissement du mérozoïte grâce à un système de motilité basée sur le complexe actine-myosine parasitaire [12, 13].

Après l'invasion, le mérozoïte induit au niveau du globule rouge parasité par endocytose et exocytose, un réseau tubulo-vésiculaire à partir de sa vacuole parasitophore, ainsi que la modification de la composition lipidique et protéique de la membrane plasmique érythrocytaire, selon des modalités qui ne sont par encore bien élucidées.

Il existe un point de contact entre la membrane plasmique parasitaire et la membrane de la vacuole parasitophore, qui s'invaginent toutes deux, pour former le cytostome, sorte de vésicule d'endocytose du cytoplasme de l'érythrocyte, qui est dirigé vers la vacuole digestive du parasite. Dans cette vacuole digestive, le contenu du cytoplasme érythrocytaire (principalement l'hémoglobine) est dégradé jusqu'à 75%. La dégradation de l'hémoglobine produit de l'hématine, qui est très toxique pour le parasite. Toutefois, le parasite induit la polymérisation de l'hématine en un pigment : l'hémozoïne, qui s'accumule dans la vacuole digestive [12].

2.2.2. *Schizogonie et libération des mérozoïtes*.

Le mérozoïte se différencie au sein de la vacuole parasitophore en anneau, puis devient trophozoïte, stade à partir duquel une intense phase réplicative commence. A l'intérieur du globule rouge, le parasite initie la sécrétion de protéines qui seront soit résidentes dans le cytoplasme soit incorporées dans la membrane plasmique de l'hématie [12]. Ces protéines parasitaires de surface formeront des protubérances appelées "knobs". *Plasmodium falciparum* est le seul des quatre espèces plasmodiales humaines à induire des "knobs". Ceux-ci sont essentiellement constitués par des protéines adhésives : le PfEMP-1, les rosettines et les rifines qui ont de l'affinité pour des récepteurs de surface des cellules endothéliales, des monocytes ou des globules rouges non infectés [14].

Le jeune trophozoïte évolue en un schizonte pigmenté. Le noyau du schizonte se divise plusieurs fois pour former les corps en rosace. Le globule rouge parasité se dissocie en deux temps pour libérer les mérozoites. Il y a d'abord désintégration de la membrane plasmique érythrocytaire, suivie de la libération des schizontes de la membrane du parasitophore vacuolaire. Ces deux étapes sont contrôlées par deux processus protéolytiques distincts. Tous les globules rouges parasités au même moment éclatent en même temps. Les mérozoïtes ainsi libérés peuvent chacun parasiter un globule rouge naïf à la fois. Ainsi s'entame un nouveau cycle schizogonique. La durée du cycle schizogonique de *Plasmodium falciparum* est de 48 heures et produit 16 mérozoïtes à chaque nouveau cycle.

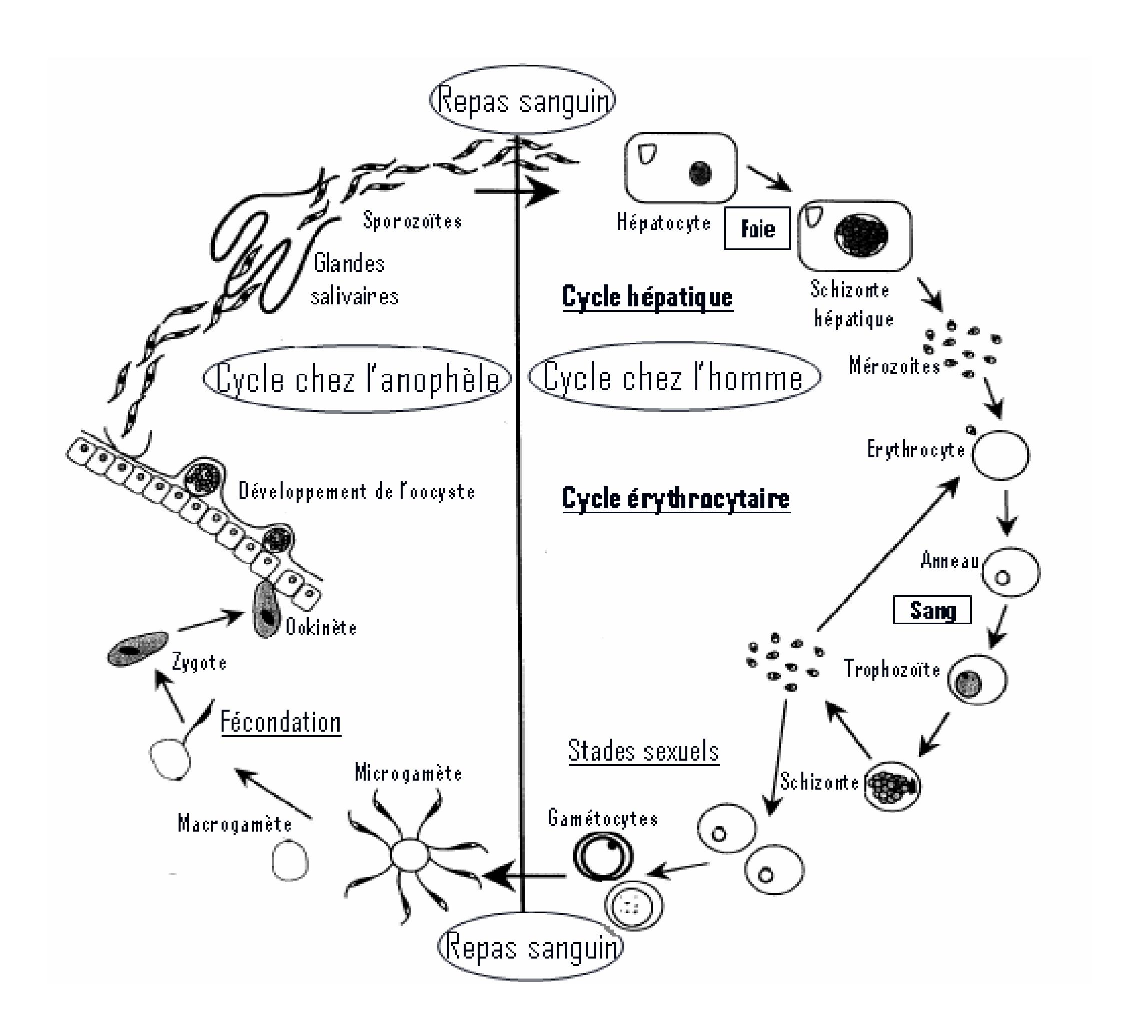


Figure 1: Cycle de développement de Plasmodium falciparum. Au moment du repas sanguin un moustique infecté injecte les sporozoïtes qui sont accumulés dans ses glandes salivaires au niveau des capillaires sous-cutanés. Par le même procédé les moustiques non porteurs de sporozoïtes peuvent prélever du sang infecté au cours d'un repas sanguin ; seuls les gamétocytes seront capables de survivre au niveau du moustique. Au cours de son cycle biologique *Plasmodium falciparum* adopte plusieurs stades morphologiques et métaboliques. Les complications cliniques du paludisme ne se manifestent qu'après plusieurs générations du cycle érythrocytaire [figure extraite de la référence 11].

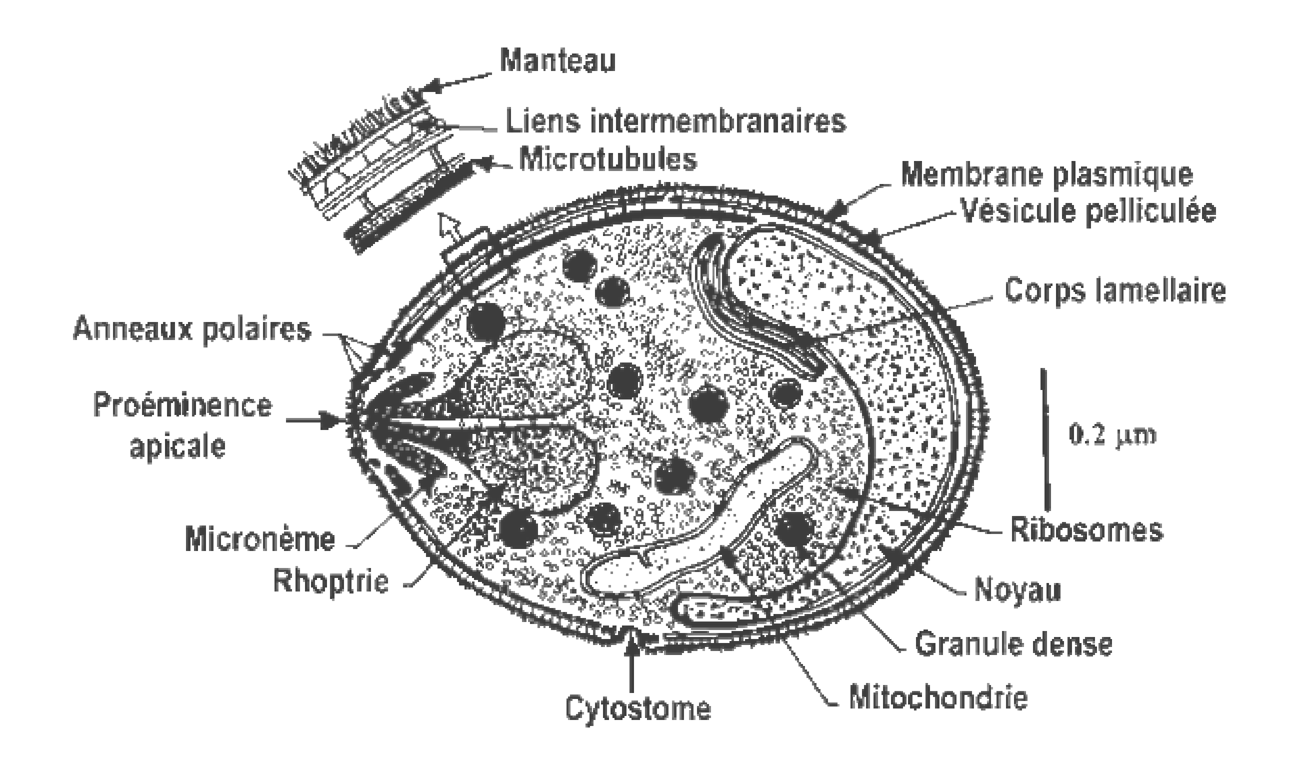


Figure 2: Représentation schématique d'une section longitudinale d'un mérozoïte de Plasmodium falciparum. Ce schéma résume les observations de microscopie électronique. On note une répartition polarisée des organites intracellulaires, avec le noyau et la proéminence apicale situés aux deux pôles. La membrane plasmique est recouverte d'un épais manteau de glycoprotéines. Sous la membrane de surface, le cytosquelette est organisé en fibrilles d'actine et de microtubules. Ce dispositif assure la motilité nécessaire au parasite une fois qu'il est attaché à la cellule qu'il doit envahir. Au niveau de la proéminence apicale, les anneaux polaires permettront l'attachement définitif du mérozoïte à la cellule cible. En dessous de la proéminence apicale et des anneaux polaires on trouve des organites dénommés micronèmes et rhoptries. Ces saccules contiennent à l'avance toutes les molécules indispensables à la pénétration du globule rouge par le parasite et à la constitution synchronisée de la vacuole parasitophore [figure extraite de la référence 13].

2.3 Gamogonie

Après plusieurs cycles érythrocytaires, certains schizontes se transforment en gamontes à potentiel mâle ou femelle, qui se différencient rapidement en gamétocytes mâles ou femelles. Lorsque l'anophèle femelle prend son repas sanguin, elle aspire tous les stades évolutifs du *Plasmodium falciparum* contenus dans le sang. Seuls les gamétocytes vont pouvoir survivre aux systèmes digestif et immunitaire du moustique. Au niveau l'intestin du moustique, le gamétocyte mâle subit une division haploïdique appelée gamogonie qui donne naissance à plusieurs gamètes mâles. Le gamétocyte femelle poursuit sa maturation pour se transformer en gamète femelle. La fécondation a lieu dans la lumière intestinale du moustique. Il se forme alors un oeuf mobile, l'oocinète. Cet oeuf traverse la paroi intestinale du moustique pour se localiser dans la cavité digestive générale. L'oeuf subit plusieurs divisions diploïdiques sporogoniques et donne naissance à plusieurs sporozoïtes. Ces

derniers remontent dans les compartiments supérieurs du système digestif du moustique pour s'accumuler dans les glandes salivaires.

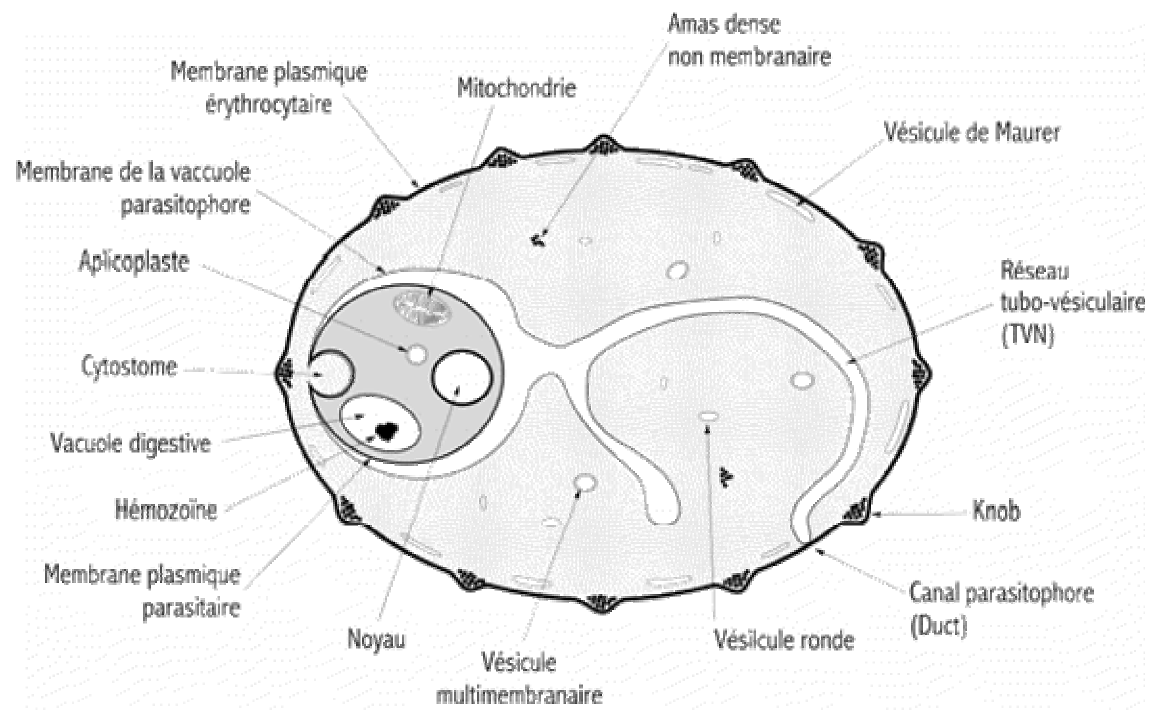


Figure 3: Représentation schématique d'un érythrocyte colonisé par Plasmodium falciparum. On observe un grand nombre de structures membranaires et d'inclusions qui n'existent pas au niveau des globules rouges naïfs [figure extraite de la référence 13].

III. Symptômes

1. L'infection asymptomatique

Le portage parasitaire n'est pas toujours corrélé à la manifestation des symptômes, surtout en zone de transmission très intense comme en République du Congo. A partir de l'injection des trophozoïtes par l'anophèle femelle jusqu'au stade hépatique, le sujet infesté se trouve dans un état asymptomatique. Il faut plusieurs cycles érythrocytaires avant la manifestation des premiers symptômes chez le sujet sensible.

Certains sujets sont résistants, on parle de prémunition. Cette prémunition peut se manifester, d'une part, par une immunité clinique qui se caractérise par l'absence de manifestations des effets délétères du parasite sur la physiologie de l'hôte et, d'autre part, par une immunité antiparasitaire qui se caractérise par l'adaptation du système immunitaire de ces sujets qui contrôle la parasitémie à un niveau très bas.

2. *Les accès palustres simples*

Les premiers signes cliniques se manifestent par une fièvre modérée d'apparition progressive. La courbe thermique à un décours cyclique qui est rythmé par l'éclatement synchronisé des globules rouges parasités. Ce rythme est d'un jour sur deux (fièvre tierce) pour *Plasmodium falciparum,* mais il peut également y avoir une fièvre quotidienne. Ces poussées de fièvre surviennent souvent le soir et sont précédées de prodromes. Ils se déroulent en phases qui se répètent à un rythme régulier.

On observe donc :

- un stade de frissons intenses accompagnés d'une température de 39 à 40°C et d'une baisse de la tension artérielle ; le patient frissonne sous les couvertures.
- un stade de fièvre sèche pendant lequel la température s'élève à 40 ou 41°C, la peau est sèche et brûlante ; le patient rejette ses couvertures.
- un stade de sueurs abondantes : la température retombe, la tension artérielle remonte. Le patient émet des urines foncées.

En dehors des poussées de fièvre, l'accès palustre simple est généralement précédé de légers symptômes tels que des céphalées, de la fatigue, des courbatures, de l'anorexie, des vomissements ou des diarrhées chez les enfants.

3. *Les accès palustres graves*

Il s'agit des complications apportées par une souche virulente de *Plasmodium falciparum*. On observe donc :

- Une densité parasitaire élevée.
- Une pâleur de la peau et des muqueuses.
- Une fatigue générale associée à un essoufflement (dyspnée).
- Des convulsions (chez l'enfant).
- Des troubles de la conscience (coma).
- Une hypotension.
- Une thrombocytopénie.

Ces symptômes s'associent parfois à une insuffisance rénale nécessitant une dialyse ainsi qu'à une détresse respiratoire aiguë qui requiert une ventilation artificielle [14].

IV. Physiopathologie du paludisme.

La sévérité du paludisme semble être la résultante d'une hypoperfusion sanguine des organes essentiels et d'un déficit en oxygène et en nutriments. Ce déficit dépend, d'une part, des facteurs de virulence du parasite et, d'autre part, des facteurs de susceptibilité au niveau de l'hôte humain. Notons que certaines souches se spécialisent dans certaines formes de paludisme de type placentaire, cérébral ou viscéral. Les accès fébriles et les périodes de morbidité les plus sévères du paludisme ont lieu après l'éclatement des globules rouges parasités qui exposent le sang et la paroi vasculaire aux schizontes, à l'hémozoïne, à des lipides et à des protéines parasitaires qui sont diffusibles ou ancrées à la surface des schizontes.

1. Rigidité des Globules Rouges parasités

Normalement, les globules rouges se faufilent à travers le faible calibre des capillaires grâce à leur flexibilité. Les globules rouges parasités deviennent très rigides au moment de la formation des trophozoïtes. Il en résulte un transit difficile au niveau des capillaires qui peut conduire à une mauvaise perfusion de certains lits vasculaires. Ces globules rouges parasités peuvent être prélevés de la circulation au niveau de la rate. Toutefois, par un mécanisme encore inconnu, certains globules rouges non parasités perdent leur flexibilité et, ainsi, ont une demi-vie plus courte chez un sujet impaludé, car ils subissent aussi un prélèvement prématuré au niveau de la rate [15].

2. Anémie

Plasmodium falciparum dégrade les protéines du globule rouge pour s'approvisionner en acides aminés nécessaires à sa croissance. L'hémoglobine (75-80%) est la principale source d'acides aminés. Ceci entraîne une chute de la capacité de transport d'oxygène du sang. L'hémolyse des érythrocytes parasités au moment de la libération des schizontes entraîne une diminution significative de l'hématocrite, qui s'amplifie avec la progression exponentielle de la proportion des globules rouges parasités à chaque cycle et avec l'élimination des globules rouges parasités par la rate [12]. Par ailleurs, l'anémie palustre est aggravée par des facteurs humoraux parasitaires (hémozoïne, antigènes de surface et GPI) et humains (cytokines, NO) qui induisent une diminution de la formation *de novo* des globules rouges [14, 15].

3. Cytoadhérence et rosetting

Les autopsies de victimes du paludisme sévère démontrent au niveau anatomo-histopathologique, une accumulation de globules rouges parasités au niveau des capillaires et des veinules. Cet encombrement de la microcirculation est dû aux facultés adhésives des « knobs » qui

sont présents à la surface des globules rouges parasités par *Plasmodium falciparum*. Les knobs permettent l'adhésion des globules rouges parasités, d'une part, à la surface des cellules endothéliales et, d'autre part, aux cellules sanguines [14, 15].

La cytoadhérence est due à l'expression de protéines adhésives du parasite qui ont une affinité pour des récepteurs exprimés à la surface des cellules endothéliales. La cytoadhérence peut impliquer l'un ou l'autre des sept types de récepteurs endothéliaux suivants : le CD36, la thrombospondine, l'ICAM-1, les VCAM, la selectine E, les PECAM-1 ou CD31 et la CSA [15 - 18]. Le PfEMP-1 est le principal ligand parasitaire qui intervient dans l'interaction avec les cellules endothéliales.

Une autre forme de cytoadhérence concerne les cellules sanguines ; elle est appelée « rosetting ». Celui-ci est caractérisé par l'agglutination des érythrocytes infectés non seulement entre eux mais aussi avec les érythrocytes non infectés, les plaquettes sanguines et les monocytes [15]. Outre le PfEMP-1, *Plasmodium falciparum* induit l'expression de protéines adhésives appelées rosettines et rifines qui ont de l'affinité pour des récepteurs à la surface des globules rouges non infectés, des monocytes ou de protéines plasmatiques qui servent de ponts avec les cellules du sang (ex : facteur de Von Willebrand, thrombospondine, etc.). Il a été démontré que le rosetting des globules rouges non infectés est lié aux antigènes du système ABO, qui interviennent en tant que corécepteurs (Figure 4) [16 - 18].

C'est l'adhérence des globules rouges parasités à l'endothélium microvasculaire et le rosetting qui conduisent à la séquestration des globules rouges parasités au niveau des capillaires et des veinules post-capillaires. Ce mécanisme permet à *Plasmodium falciparum* d'échapper au prélèvement et à la destruction par la rate. *Plasmodium falciparum* est le seul hématozoaire capable de provoquer ainsi l'obstruction des capillaires chez l'homme. Ce particularisme est le fondement de la létalité de *Plasmodium falciparum*.

4. Hémozoïne

C'est le métabolite résiduel de la dégradation de l'hémoglobine par *Plasmodium falciparum*. Sa formation est la cible principale des médicaments anti-paludiques les plus courants [19]. Le taux plasmatique d'hémozoïne est fortement corrélé à la poussée de fièvre caractéristique des accès palustres. En effet, en présentant l'ADN parasitaire au récepteur TLR-9 des cellules dendritiques immunitaires, l'hémozoïne entraîne une poussée de fièvre par le système immunitaire inné [19]. L'hémozoïne est capable d'induire la sécrétion de cytokines et la production du NO par les monocytes sanguins. La production du NO fait suite à l'induction de la transcription du gène codant pour la NO synthétase II et à la synthèse *de novo* de cette enzyme [20].

Les effets de l'hémozoïne sur les monocytes placentaires affectent les fonctions immunes de la production des protéines inflammatoires [21]. L'hémozoïne est ingérée par les phagocytes du sang entraînant la diminution de la production d'IL-12, une cytokine inhibitrice de la production des cytokines inflammatoires [22]. L'ingestion de l'hémozoïne par les monocytes altère l'expression des antigènes de la classe II du complexe majeur d'histocompatibilité [23]. Ainsi, l'hémozoïne est un médiateur de la sévérité des symptômes du paludisme.

5. Glycosylphosphatidyl inositol

Certaines protéines de surface de *Plasmodium falciparum* sont ancrées à la bicouche phospholipidique par un groupement glycosylphosphatidyl inositol (GPI). Le GPI joue un rôle prédominant dans la physiopathologie du paludisme évoquée par *Plasmodium falciparum* [15]. En effet, il est désormais établi que le GPI a des effets toxiques à l'instar de l'endotoxine des bactéries gram négatives, par exemple. Ainsi, les sujets porteurs de taux sériques élevés des anticorps anti-GPI ne sont pas victimes des manifestations graves de l'infection par *Plasmodium falciparum*. Il est donc proposé une stratégie vaccinale de contrôle du paludisme qui est basée sur la prémunition des dysfonctionnements physiopathologiques induits par *Plasmodium falciparum* [15, 17, 24].

Au cours de la pénétration des globules rouges, les mérozoïtes perdent au fur et à mesure leur couverture protéinique de surface, qui est suivi de l'hydrolyse du GPI d'ancrage à la bicouche lipidique parasitaire. Les expérimentations de mutagenèse dirigée montrent que la plupart des protéines ancrées par des GPI sont essentielles au processus d'invasion des globules rouges ou de croissance intra-érythrocytaire [25].

Ainsi, l'élucidation des voies de biosynthèse du GPI au niveau de ce protozoaire donne l'espoir du développement rapide d'inhibiteurs spécifiques de la synthèse du GPI par *Plasmodium falciparum*. En effet, les protéines de surface ancrées au GPI sont essentielles à la vie du parasite. Le blocage spécifique de la biosynthèse de GPI par les protozoaires fournirait des médicaments efficaces contre tous les stades de développement du parasite [26].

Le GPI évoque la sécrétion de cytokines inflammatoires par les cellules immunitaires en se fixant aux récepteurs TLR-2 [27]. Le GPI a également des actions insulino-mimétiques qui pourraient contribuer à la mobilisation du glucose par *Plasmodium falciparum*, et ainsi provoquer l'hypoglycémie qui est observée dans les cas de paludisme sévère [28]. Ces effets insulino-mimétiques sont partagés par des GPI d'origine végétale, protozoaire ou animale. Les effets inflammatoires du GPI sont atténués par des acides gras (acides palmitique et myristique) qui sont également libérés par les protozoaires [29, 30]. Cet effet modulateur permet une plus longue survie du patient et donc une prolongation de la capacité du parasite à survivre.

6. Cytokines inflammatoires

Des enquêtes épidémiologiques avaient révélé que la sévérité des manifestations cliniques du paludisme est fortement corrélée aux taux sériques du tumor necrosis factor α (TNFα) [15, 17]. L'approfondissement des recherches dans ce domaine a permis aujourd'hui d'évoquer une production de cytokines par vagues cycliques qui sont rythmées par l'éclatement des globules rouges parasités. De nombreuses cytokines inflammatoires sont ainsi produites, accompagnées toutefois de production plus ou moins atténuée de cytokines anti-inflammatoires.

Certes les taux sériques de cytokines sont un indicateur important de l'évolution de la maladie et de sa sévérité, cependant, il importe de souligner que c'est au niveau de la microcirculation que la synergie entre les toxines parasitaires, l'hypoxie (consécutive à l'hypoperfusion), et les cytokines inflammatoires provoquent une cascade de dysfonctionnements intra-vasculaires [18].

Parmi ces dysfonctionnements, il faut noter l'encombrement des veinules par l'expression de protéines adhésives à la surface des cellules endothéliales, la cytoadhesion des globules rouges parasités, la production par l'endothélium et les plaquettes de protéines qui contribuent au rosetting.

L'hypoperfusion peut se généraliser à des lits vasculaires non encombrés à cause de l'augmentation de la sécrétion des substances constrictrices des artérioles et des veinules telles que l'endothéline-1. L'exagération de l'activation inflammatoire de l'endothélium peut conduire à l'expression du facteur tissulaire qui va promouvoir la coagulation intravasculaire. La thrombocytopénie, une caractéristique des formes sévères du paludisme, atteste de l'activation des plaquettes qui induisent la vasoconstriction et l'hémostase périphérique.

La neutralisation de la production de toxines malariques ou la modulation des actions de ces toxines et des cytokines humaines, qui en dérivent, constituent des cibles pharmacologiques pour le développement de traitements symptomatiques du paludisme.

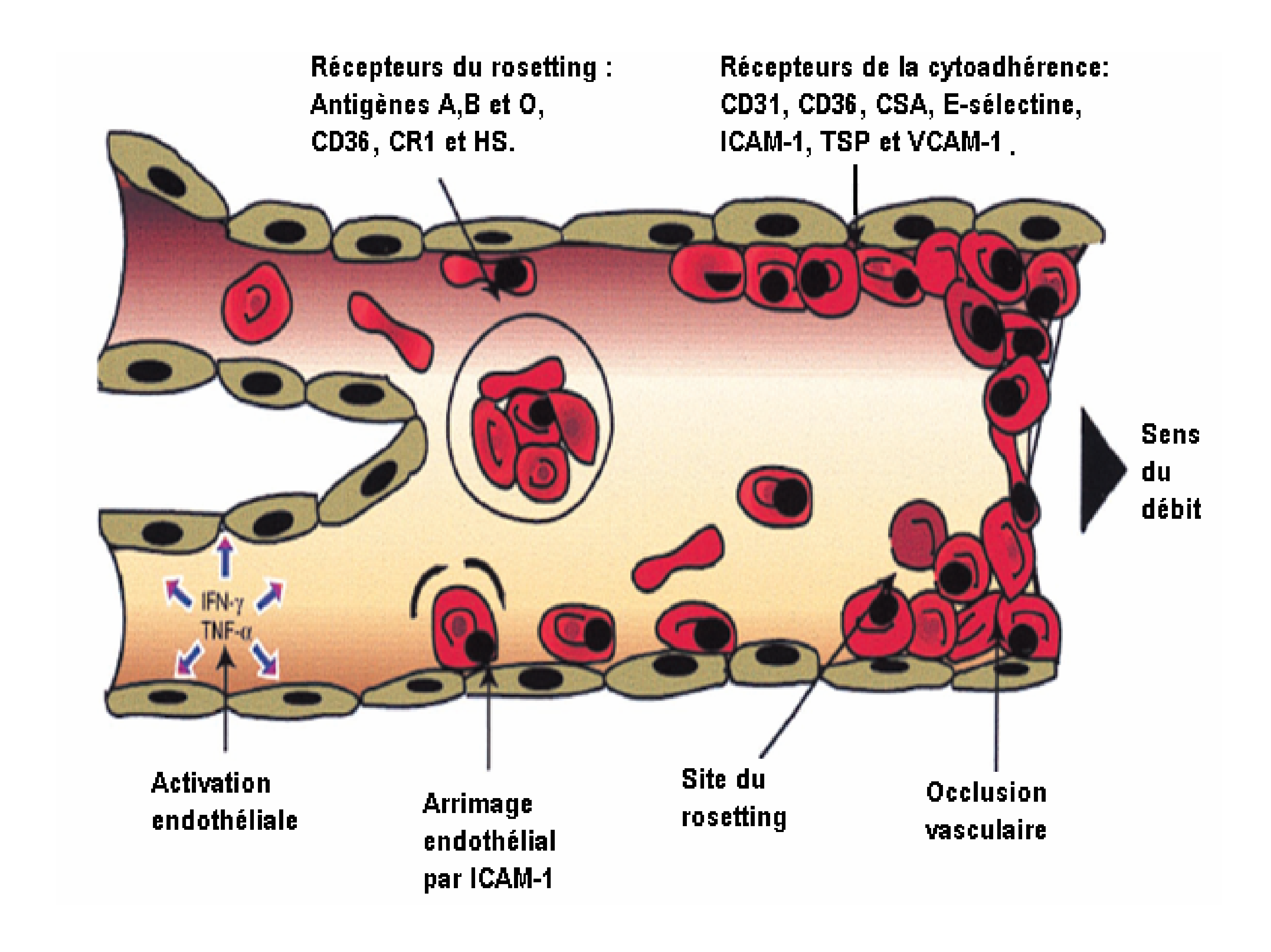


Figure 4: Cytoadhérence et rosetting. Le globule rouge parasité qui est représenté ici par une hématie avec un noyau a des propriétés adhésives qui lui permettent d'évoquer une agglutination des cellules sanguines autour de lui (rosetting). Le réseau capillaire est un site à faible pression, et il débouche dans le compartiment veineux qui est de basse pression. A ce niveau, l'expression de récepteurs ICAM-1 à la surface de l'endothélium permet d'arrimer les globules rouges parasités à la paroi veineuse. Suite à la schizogonie, il y'a éclatement des globules rouges parasités qui permet la libération de facteurs humoraux qui vont agir localement pour amplifier l'expression des récepteurs endothéliaux. Il y'a synergie entre les effets des toxines parasitaires, de l'hypoxie et des cytokines, dont la sécrétion est évoquée par les toxines parasitaires et l'hypoxie. En particulier, le pigment malarique se dépose à la surface de l'endothélium pour y demeurer adsorbé [figure extraite de la référence 15].

V. ***Traitement du Paludisme***

La prise en charge thérapeutique du paludisme dépend de plusieurs facteurs notamment de l'espèce de parasite en cause, de la gravité de l'infection, de l'âge de la personne atteinte et du profil de résistance aux médicaments antipaludéens dans la région du monde où la personne a contracté la maladie.

Il existe plusieurs molécules antipaludiques (Tableau I). Le traitement du Paludisme repose encore dans de nombreux pays africains sur la quinine et ses dérivés. Ces molécules inhibent la polymérisation de l'hématine en hémozoïne au sein de la vacuole digestive au cours du cycle érythrocytaire (car la polymérisation de l'hème évite une toxicité qui serait mortelle pour le protozoaire). Cependant, à travers diverses mutations, y compris les systèmes de transport qui permettent d'évacuer les médicaments qui s'accumulent dans la vacuole digestive, les parasites parviennent progressivement à développer une résistance aux dérivées de la quinine. Ainsi, dans la plupart des régions impaludées, le paludisme à *Plasmodium falciparum* est devenu résistant à la Chloroquine et l'Amodiaquine [31].

Certains antipaludiques ciblent d'autres étapes du métabolisme des schizontes. Par exemple, la Sulfadoxine et la Pyréthamine agissent sur le métabolisme des acides nucléiques. Ils sont utilisés en combinaison pour éviter le développement rapide des résistances. En plus d'une action inhibitrice sur la dégradation de l'hémoglobine et la formation de l'hémozoïne, l'Artémisinine et ses dérivés (Artésunate, Artéméther, Dihydroartémisinine) altèrent le métabolisme intracellulaire du Ca^{2+} au niveau du *Plasmodium falciparum* [32, 33]. Ce mécanisme pourrait expliquer son action à la fois schizonticide et gamétocide. Dans l'attente d'une nouvelle génération de schizonticides, il importe de freiner l'apparition de mutants résistants à l'Artémisinine.

C'est pourquoi l'OMS recommande d'utiliser des médicaments associant les dérivés de l'Artémisinine et des antipaludiques classiques tels que sulfadoxine-pyréthamine ou amodiaquine.

Le décryptage des génomes humain et du *Plasmodium falciparum* permettra une connaissance approfondie de la biologie du parasite et des dysfonctionnements induits au cours du paludisme. Ainsi, il y'aura de nouvelles perspectives qui vont s'offrir pour la définition d'antipaludiques plus efficaces et moins nocifs.

Les antipaludiques sont utilisés en prophylaxie ou en thérapeutique. Toutefois, ces médicaments ne sont pas dénués d'effets secondaires. On note en particulier une toxicité cardiaque pour l'halofantrine et neurologique pour la méfloquine [34]. L'existence d'effets secondaires n'est pas propre aux antipaludiques ; elle est une variable commune à toutes les spécialités pharmaceutiques ayant un index thérapeutique faible.

Tableau I: DCI, noms commerciaux et mécanismes d'action des antipaludiques trouvés.

Dénominations Communes Internationales	Noms Commerciaux	Mécanismes d'action
CHLOROQUINE	Aralen®	Altère la morphologie de la vacuole digestive parasitaire tout en s'y accumulant. Inhibe l'incorporation de l'hème libre ans la ß–hématine (pigment malarique)
QUININE	QUINIMAX®, QUININE®	Entraînerait au niveau cellulaire une modification du métabolisme de l'hématie parasitée et une rupture des membranes parasitaires.
MEFLOQUINE CHLORHYDRATE	LARIAM®	Schizonticide dont le mécanisme précis d'action reste à préciser. Elle est active sur les souches multi-résistantes à d'autres médicaments.
AMODIAQUINE	FLAVOQUINE®	Schizonticide dont le mécanisme précis d'action reste à préciser. Comme la quinine, elle formerait des complexes avec les nucléoproteines entraînant l'inhibition de la biosynthèse de l'ARN et de l'ADN, Elle diminuerait la fixation d'oxygène par le plasmodium.
PRIMAQUINE DIPHOSPHATE		Schizonticide sur les formes exo érythrocytaires et sur les formes érythrocytaires de *plasmodium* vivax, mais pas sur *plasmodium falciparum*. Empêche le développement des gamètes de tous les *Plasmodiums* de l'homme dans le tube digestif de l'anophèle.
SULFADOXINE/ PYRIMETHAMINE	FANSIDAR®	La pyriméthamine est un antifolinique d'action lente. L'action antiplasmodiale est potentialisée par l'association avec la sulfadoxine, sulfamide à action prolongée. Les deux agissent en synergie comme inhibiteurs enzymatiques pour bloquer la synthèse des nucléotides du parasite aux différents niveaux de synthèse.
PYRIMETHAMINE	MALOCIDE®	Shizonticide. inhibe également la sporogonie (évolution des gamétocytes dans l'estomac de l'anophèle) et la dihydrofolate réductase, enzyme catalysant la réduction du dihydrofolate en tétrahydrofolate. Le déficit en tétrahydrofolate perturbe la synthèse des bases puriques et de la thymine.
HALOFANTRINE CHLORHYDRATE	HALFAN®	Schizonticide actif au stade érythrocytaire par un mécanisme qui pourrait être similaire à celui de la quinine et impliquer la formation de complexes toxiques avec la ferriprotoporphyrine IX formée pendant la digestion de l'hémoglobine par le *Plasmodium*. Activité sur toutes les souches de *Plasmodium* dont les souches multi résistantes, en particulier *Plasmodium falciparum* chloroquino-résistant.
ARTEMISININE ET DERIVES	ARTESIANE®, ARTESUNATE®,	Altèrent le métabolisme intracellulaire du Ca^{2+} parasitaire. Génére des radicaux libres. Inhiberait la biosynthèse de l'hème ou causerait la dégradation de l'hémozoïne. Des dérivés hydrosolubles l'hydroartémisinine et artésunate ont été développés. Les dérivés liposolubles dont l'artémether sont à la fois schizonticides et gaméticides.

Références : http://www.biam2.org/www/Sub2185.html, http://www.santetropicale.com/rwanda/index.htm.

VI. ***Plantes médicinales et traitement du Paludisme***

La politique de prise en charge à domicile de l'Organisation Mondiale de la Santé est basée sur les principes suivants : « l'accès rapide à un traitement antipaludique efficace est l'un des meilleurs moyens de réduction de la charge du paludisme. Pour que l'accès soit rapide, le traitement doit se trouver aussi près du domicile que possible afin d'être administré dans les 24 heures qui suivent l'apparition des symptômes. En Afrique, où la mortalité palustre est particulièrement élevée, les décès surviennent avant d'arriver dans un établissement de santé. » [35].

Des traitements antipaludiques ancestraux dérivent de plantes médicinales, parmi lesquels le Cinchona plante d'Amérique Latine dont la quinine est extraite à partir de l'écorce et l'*Artemisia annua* plante chinoise dont est extraite l'artémisinine.

Au Ghana, au Mali, au Nigeria et en Zambie, le traitement de première intention pour 60% des enfants atteints de forte fièvre due au paludisme fait appel aux plantes médicinales administrées à domicile. Au Congo, vingt six plantes présumées antipaludiques ont été recensées (Tableau II). Pour certaines de ces plantes, leur action antipaludique a été évaluée *in vivo* et *in vitro* [8, 36].

Face à l'émergence croissante des souches résistantes aux spécialités pharmaceutiques antipaludiques, il est intéressant d'envisager l'isolement des principes actifs de ces diverses plantes en vue de développer de nouvelles spécialités pour le traitement allopathique du paludisme sévère. L'avantage de l'isolement des principes actifs est de pouvoir mener des tests exhaustifs pour définir le dosage, les conditions de conservation, les situations de prescription et les effets toxiques.

Cependant, la purification des composés chimiques d'une plante médicinale a aussi des inconvénients. En effet, certaines plantes médicinales renferment des schizonticides appartenant à de différentes familles chimiques et ayant une action synergique. C'est par exemple le cas d'*Artemisia annua* qui, en plus de l'artémisinine, comporte une lactone sesquiterpénique et des flavonoïdes qui sont également antipaludiques. Ainsi, la coexistence de ces différentes molécules expliquerait la non apparition de chimiorésistance à cette plante médicinale après des millénaires d'utilisation.

A l'inverse, l'utilisation séparée des spécialités pharmaceutiques dérivées de plantes médicinales induit des mutants résistants au bout de quelques générations en culture. L'exploitation en monothérapie d'un seul des principes actifs schizonticides d'Artemisia *annua* va donc conduire à des chimiorésistances à l'artémisinine qui ne seraient probablement pas apparu avec l'utilisation des extraits de la plante, conformément à la pharmacopée Chinoise. La stratégie actuelle de thérapie combinée de l'OMS imite donc une situation qui est naturellement trouvée au sein de la plante médicinale *Artemisia annua.*

Tableau II: Liste de quelques plantes congolaises antipaludiques.

Noms Scientifiques (famille)	Noms vernaculaires	Partie utilisée
Cassia occidentalis (Cesalpiniaceae)	Nkassa ntari ; mounsoundi nsoudi	Racines, fruits
Cassia siamea (Cesalpiniaceae) *	Nkassa ntari ; mounsoundi nsoudi	
Cassia spectabilis (Cesalpiniaceae) *	Nkassa ntari ; mounsoundi nsoudi	
Quassia africana (Siamaroubaceae) *	Moumpechi ; yoombo	Racines, feuilles
Tetracara alnifolia (Dilleniaceae) *	Nkazou ; nkabousou	Feuillles, tiges
Nauclea latifolia Smith (Rubiaceae)	Tienga; mountoumbi	Racines
Rauwolfia vomitoria (Apocynaceae)	Munungu; bakuyu	Racines
Gardenia ternifolia (Rubiaceae)	Kilembazaou	Racines, écorces
Titonia diversifolia (Asteraceae)	Moundoudoudi	Feuilles
Acanthospernum hispidium Acanthaceae)	Madiata ngombè	Toute la plante
Cycicodiscus gabonensis Harms (Mimosaceae)	Moudoumou	écorces
Vites madiensis (Verbenaceae)	M'filu wa makanga	Racines
Azadirachta indica (Meliaceae)		Feuilles
Hua gabonii Pierre (Hyppocrateceae)		Feuilles
Heinssia trinita Afz Taylor (Haemordaceae)		Racines
Chenopodium ambrozoides Linn (Chenopodiacea)		Racines
Morinda morindoides (Rubiacceae)		Feuilles
Citrus aurantifolia (Rutaceae)		fruit
Ageratum conyzoides Linn (Asteraceae)		Racines
Hyptis suaveolens (Hypericaceae)		Toute la plante
Sapium cornotum (Samydaceae)		Racines, feuilles
Costus afer (Zingiberaceae)		Tige
Ocimun gratissimum Linn (Lamiaceae)		feuilles
Citrus aurantifolia (Rutaceae)		Racines
Anans comous Linn (Bromeliaceae)		
Cymbopagon citratus (Cucurbitaceae)		

***** Plante dont l'effet antipaludique a été testé scientifiquement. La liste exhaustive des noms vernaculaires n'a pas été présentée. Les noms indiqués le sont à titre d'illustration [8].

L'utilisation des plantes médicinales se heurte à l'absence de données expérimentales ou cliniques sur leur toxicité. Cette objection fait pourtant fi de la jurisprudence qu'apporte une utilisation, parfois millénaire, de certaines plantes médicinales. De plus, les tradithérapeutes sont souvent conscients de la dangerosité de certaines plantes d'où la nécessité de formuler des combinaisons de plantes parfois. Il est donc peut être plus important de valider scientifiquement l'utilisation de ces plantes en standardisant leur préparation et en stabilisant leur formulation galénique traditionnelle afin d'obtenir des actions thérapeutiques reproductibles. Ceci s'apparente à la pharmacovigilance ou aux essais cliniques de phase IV dont le rôle est de notifier les effets secondaires des spécialités pharmaceutiques récemment mises sur le marché.

La validation scientifique est le talon d'Achille de la médecine traditionnelle congolaise, car, le plus souvent, les tradithérapeutes ne disposent pas d'outils de diagnostic. Lorsque l'on sait que le

paludisme présente des symptômes et une physiopathologie semblable à de nombreuses maladies infectieuses et métaboliques, il n'est pas surprenant que les mêmes plantes médicinales soient utilisées pour des affections diverses. Ceci suggère que les plantes contiennent peut être des parasiticides qui sont associées à des substances ayant des effets bénéfiques contre les dysfonctionnements physiopathologiques induits par les toxines malariques.

VII. ***<u>Description de Trema orientalis et usages traditionnels</u>***

1. Position systématique

Embranchement des **Angiospermes**
Classe des **Eudicots triaperturées dicotylées**
Sous-classe des **Eudicots moyennes ou Rosideae (Eurosidea I)**
Ordre des **Rosales**
Famille des **Ulmaceae**
Genre **Trema**
Espèce **orientalis**

(Synonyme *Trema guineensis*) [37,38].

2. Description et phytogéographie

Trema orientalis est un arbuste héliophile qui, en Afrique, se retrouve communément au niveau d'une aire géographique qui s'étend du Sénégal à l'Ouest vers la Somalie à l'Est, en passant par toute la région d'Afrique centrale jusqu'au Malawi au Sud-Est. On le retrouve aussi de l'ouest de l'Himalaya jusqu'au Pacifique, au Japon du sud, en Amérique du Sud et atteint l'Australie.

Il peut aller jusqu'à 18 m de hauteur. Les jeunes branches sont sveltes et veloutées. Les fleurs sont petites, vertes ou blanches- verdâtres, unisexuées. Le fruit est petit, rond et charnu. Il a un système racinaire étendu qui lui permet de subsister pendant de longues périodes de sécheresse (Figure 5) [37-41].

3. Usages

En République du Congo, *Trema Orientalis* est capable de pousser n'importe où à travers le territoire national. Les enquêtes ethnobotaniques ont démontré une appellation de cette plante en langues locales au niveau de seize ethnies du Congo (tableau III) [9]. De plus les noms relevés ne

possèdent pas de racine commune. Ces données suggèrent que *Trema Orientalis* serait une plante familière aux différentes populations qui, à travers les ages, ont occupé ce territoire.

La consultation des diverses enquêtes ethnobotaniques suggère que, outre le paludisme, les tradithérapeutes du Congo prétendent que cette plante est efficace pour le traitement des affections broncho-pulmonaires, de la coqueluche, de l'asthme, des empoisonnements alimentaires (purgatif, diurétique), de la hernie, de l'ascite, des oedèmes généralisés, de la stérilité féminine, de l'anurie, de la blennorragie, de la tachycardie, de la pyorrhée alvéolaire, de l'épilepsie et des vers intestinaux [9].

Ainsi, les données linguistiques et l'usage médicinal à travers le Congo montrent qu'il s'agit d'une plante d'accès facile et d'utilisation maîtrisée dans le contexte socioculturel congolais. Toutefois, aucune validation scientifique pour l'ensemble des indications médicinales de *Trema Orientalis* n'est disponible au Congo ; à l'exception d'une étude récente sur les effets inotropes et chronotropes négatifs des extraits de *Trema Orientalis* qui a été réalisée au niveau du cœur isolé de Batracien [42].

Tableau III: noms vernaculaires de Trema orientalis en fonction de quelques dialectes Congolais.

Noms vernaculaires	**Langue**
Sose	Babinga
Yayaka	Bembé
Lishieso	Enyelé
Mushoshi	Kota
On-oué, onboumba	Koukouya
N-yaa-yaka, n-yaka yaka, nti wa nka-la	Laadi
Mwalanka	Laali
Ossossi (oshoshi), moyesi	Mbamba
Isuesue	Mbôsi
Mwasoosi	Ndasa
Mubiere-biere	Nzabi
Ewesoko	Songa
Mouyayaka	Soundi
Nyien yaka	Tié
Lugungo lwa Ndzambi, Nsosobi	Vili
Mushaushu	Yaa

Trema Orientalis bénéficie également d'appellations spécifiques en diverses langues locales dans de nombreuses nations à travers sa niche écologique (Tableau IV).

Tableau IV: noms vernaculaires de Trema orientalis ailleurs qu'au Congo.

Noms vernaculaires	Langue	Pays
Chickan, chikan, jiban, jibon	Bengali	Bangladesh
anabiong, anadgong, pitidan	Philippin	Philippines
Gio	Hindi	Inde
telemukwu	Igbo	
anggerung, kuray, lenggung	Indonésien	Indonésie
anggerung	Javanais	Java (Indonésie)
srô:l	Khmer	Cambodgien
po: hu:	Lao (Sino-tibétain)	Laos
Kasisa	Luganda	
menarong, mengkirai, randagong	Malais	Malaisie
mchende	Nyanja	
Jivanti	Sanskrit	Inde
ambaratthi, chenkolam, oma, oman	Tamil	Inde, Sri Lanka
mgendagenda, mpesi, msasa, mzunguzungu	Swahili	Kenya, Mozambique, Ouganda, Tanzanie
padang, po-haek, takhai	Thaï	Thaïlande
mululwe	Tongan	Tonga
hu dai, hu las nhor	Vietnamien	Viêt-nam
afefe	Yoruba	Nigeria, Bénin

Cette intégration dans les cultures locales reflète également une utilisation médicinale dans tous ces pays. Ainsi, dans certains pays africains [10, 43], *Trema Orientalis* serait utilisé dans le traitement des affections suivantes :

- Affections broncho-pulmonaires (Côte d'Ivoire, Burkina Faso, Sénégal).
- Antivenimeux (Sénégal).
- Empoisonnements alimentaires (Côte d'Ivoire, Mali).
- Stérilité féminine (Liberia).
- Blennorragie (République Démocratique du Congo, Afrique Occidentale, Côte d'Ivoire, Burkina Faso).
- Tachycardie (République Démocratique du Congo).
- Epilepsie (Gabon).
- Vers intestinaux (Afrique Occidentale, Nigeria, Togo, Côte d'Ivoire, Burkina Faso).
- Dysenterie (Afrique Occidentale, Nigeria).
- Eruption cutanée (Nigeria).
- Hypertension (Togo).
- Crises convulsives de l'enfant (Togo).
- Affection de la sphère O.R.L (Togo).
- Dépérissement, manque d'appétit (Gabon).
- Vomissements (Gabon).

- Plaies de « crows crows » (Gabon).
- Démangeaisons (Côte d'Ivoire).
- Ictères, fièvres (Côte d'Ivoire).
- Révulsif (Côte d'Ivoire).
- Fièvre jaune (Côte d'Ivoire, Burkina Faso).
- Point de côté (Côte d'Ivoire).

Il est important de noter que les indications médicinales évoquées par les tradithérapeutes de ces différentes contrées de notre planète n'ont pas encore fait l'objet de travaux scientifiques qui permettent de formuler des hypothèses sur les mécanismes cellulaires et moléculaires des substances pharmaco-actives contenues dans les extraits de *Tréma Orientalis*. A l'exception d'une étude succincte démontrant les effets neurotropes de *Tréma Orientalis* [44].en appui à l'utilisation de cette plante comme anti-convulsif (Togo) et anti-épileptique (Gabon).







Figure 5: Photographie de Trema orientalis. Arbuste pouvant atteindre 15 à 18 mètres de hauteur. Les branches sont sveltes et veloutées. Les feuilles sont lancéolées et veloutées.

CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES

I. *Population d'étude*

Initialement, il était prévu de recruter les patients au niveau du cabinet du tradithérapeute tandis que des sujets naïfs, asymptomatiques et avec parasitémie négative, ont été recrutés à la Faculté des Sciences de Brazzaville.

Compte tenu des difficultés rencontrées dans le recrutement des sujets ayant une parasitémie positive, nous avons été dans l'obligation d'élargir le recrutement au niveau du Centre de Santé Intégré (CSI) de l'Armée du Salut de l'arrondissement IV (Moungali) de Brazzaville.

Les patients ont été informés de notre étude pour une éventuelle participation afin d'obtenir leur consentement éclairé. Une explication des objectifs de l'étude et des méthodes utilisées pour les atteindre a été livrée en termes accessibles à la majorité des Congolais (voire en lingala ou kituba).
Un questionnaire a été remis à tous les sujets ayant accepté de participer à cette étude (voir figure 6 en annexe).

Ainsi seuls ont été retenus les patients correspondant aux critères d'inclusion, et non éligibles aux critères de non inclusion (tableau V).

Tableau V: critères d'inclusion et e non inclusion des patients.

Critères d'inclusion	Critères de non inclusion
1. Etre âgé de 15 à 60 ans	1. Avoir moins de 15 ans et plus de 60 ans
2. Avoir une goutte épaisse positive	2. Avoir une goutte épaisse négative
3. Etre disponible	3. Avoir des troubles de conscience
4. Consentir volontairement à faire partie de l'étude (avoir un parent comme témoin si possible)	4. Avoir un syndrome hémorragique
	5. Avoir une hypersensibilité à la tisane
	6. Etre sous un traitement antipaludique

II. *Matériel*

1. Appareils, consommables et réactifs

Le matériel utilisé pour la présente étude était disponible soit au Laboratoire National de Santé Publique, au Centre d'Etudes des Ressources Végétales ou à la Faculté des Sciences. Il s'agit des appareils dont les noms et marques suivent : microscope binoculaire (Olympus CH-BI45-T-S No.3H1313), spectrophotomètre (Visual de Bio Mérieux), d'un sphygmomanomètre (Model HEM-

I8SREL de Relion), glucomètre (One Touch Ultra No. TSJ8A39RT de LifeScan Inc.), anémomètre (0623012147, HemoCue Hb 201+), thermomètre, pèse personne, toise.

Nous avons eu recours aux consommables dont les noms suivent : des bandelettes réactives One Touch Ultra (code 10, lot No. 2680492 de LifeScan Inc.), des micro cuvettes pour détection du taux d'hémoglobine (No. 5.674.457, HemoCue), des lames porte-objet (Lot 1200387, Mendel-Glaser), des tubes à EDTA, des tubes secs, des Cryotubes (Lot 093787, Nunc), des aiguilles, des gants, une micropipette de 10-100µL (Research Variable 3111, Eppendorf), des embouts de 50-1000 µl (Lot E-034-3, Brand).

Les réactifs suivant ont été utilisés : alcool à 90°, la solution de Giemsa, l'eau distillée, l'Enzyline ASAT/GOT monoréactif, l'Enzyline ALAT/GPT monoréactif.

2. *Matériel végétal*

2.1 Récolte de Trema orientalis, préparation et administration de la tisane

Les feuilles de *Trema orientalis* ont été utilisées. La récolte s'est effectuée au niveau de deux arbres situés dans le quartier la Frontière de l'arrondissement IV (Moungali). Elle s'effectuait entre 8 et 9 heures du matin. Nous avons suivi le mode opératoire du tradithérapeute pour la préparation de la tisane, son administration au patient et respecté la posologie prescrite par lui. Des procédures opératoires standardisées ont été rédigées de commun accord avec le tradithérapeute afin de reproduire le protocole au niveau de chaque patient inclus dans cette étude. Durant toute l'étude, le tradithérapeute a fait une décoction selon la procédure suivante :

- Prendre 200 grammes de feuilles de *Trema orientalis*.
- Laver abondamment les feuilles à l'eau puis les piler dans un mortier. Mettre le broyat des feuilles dans une casserole propre contenant 5 litres d'eau.
- Faire bouillir pendant 30 à 45 minutes.
- Une fois ce temps écoulé, laisser reposer a préparation, filtrer puis mettre en bouteille. Pour stabiliser le décocté, le tradithérapeute avait jugé bon d'ajouter quelques gouttes de vinaigre dans chaque bouteille.
- Administrer au patient 1/4 de verre bambou *per os* matin, midi et soir pendant 7 jours.

2.2 Screening phytochimique de Trema orientalis

Le screening phytochimique a pour objectif de révéler les familles de composés chimiques qui sont présentes au sein de l'échantillon végétal étudié. Le screening phytochimique est basé sur la réaction entre les ions (utilisés pour la révélation) et ces composés. Toutefois, le screening est plus une méthode quantitative que qualitative.

Le screening phytochimique de *Trema orientalis* a été réalisé au Laboratoire de Phytochimie du Centre d'Etudes sur les Ressources Végétales et au sein de l'Unité Chimie du Végétal de la Faculté des Sciences. Nous avons utilisé les réactifs révélateurs des saponosides, tanins, flavonoïdes, quinones, alcaloïdes, terpènes et terpènoïdes [45-49].

III. ***Suivi des patients***

Dans un premier temps une fiche de renseignements est remplie pour obtenir de chaque sujet les paramètres anthropométriques suivants : nom, âge, sexe, adresse, symptômes ressentis, et autres. Un bulletin d'examen, qui sera ensuite emmené au Laboratoire National de Santé publique, est rempli (nom, âge, sexe, adresse et type d'examen à faire).

La température axillaire est prise à l'aide d'un thermomètre à mercure placé quelques minutes sous l'aisselle du patient. Ensuite, le diagnostic de l'impaludation est réalisé selon la technique de la goutte épaisse. La procédure est la suivante : désinfecter la pulpe du doigt du patient avec du coton imbibé d'alcool. Piquer légèrement la pulpe du doigt avec du vaccinostyle stérile. Essuyer la première goutte de sang avec du coton sec puis déposer la seconde goutte sur la lame porte-objet. Défibriner la goutte de sang en l'étalant sur la lame pour éviter la coagulation du sang. Laisser sécher l'étalement. Numéroter la lame et le bulletin d'examen de parasitologie pour transmettre les renseignements du bulletin dans le cahier de laboratoire.

Nous avons aussi fait un prélèvement veineux afin de doser les Transaminases glutamino-oxaloacétique et glutamino-pyruvique, la créatininémie, le taux d'hémoglobine et la glycémie. La procédure était la suivante :

- Ouvrir une seringue neuve. Tendre le bras du sujet puis nettoyer avec du coton imbibé d'alcool la région du bras où se fera le prélèvement.
- Attacher, tout en serrant fort, le garrot. Demander au sujet de serrer son poing : une ou plusieurs veines apparaissent.
- Choisir la veine la plus visible et insérer l'aiguille. Le sang recueilli est ensuite placé dans un tube sec.

Les prélèvements capillaire (goutte épaisse) et veineux portent le même numéro que celui du bulletin du sujet puis sont acheminés au Laboratoire National de Santé Publique pour analyse. Les deux prélèvements (capillaire et veineux) sont effectués à J_0 et J_7.

1. *Mesure de la Parasitémie*

Le taux de parasites dans l'échantillon sanguin a été déterminé conformément à la procédure opératoire utilisée par le service de Parasitologie du Laboratoire National de Santé Publique. La procédure était la suivante :

- Fixer l'étalement à l'aide de la chaleur des rayons solaires ou du four Pasteur pendant 5 à15 secondes environ.
- Colorer l'étalement au Giemsa rapide dont la dilution est d'1 ml d'eau distillée pour 3 gouttes de Giemsa. La durée de la coloration est de 5 minutes.
- Après les 5 minutes, rincer la lame avec l'eau du robinet. Laisser sécher la lame.
- Lire la lame au microscope à l'objectif à immersion avec un grossissement X100. Si la parasitémie est négative, le patient est exclu de l'étude. Si la lame est positive, la parasitémie est évaluée en appliquant la formule suivante dite « Formule basée sur le nombre de champs microscopiques » :

$$P = \frac{\text{Nombre d'hématies parasitées x Nombre total d'hématies (4 000 000)}}{\text{Nombre de champs comptés x Nombre total de champs (200)}}$$

Les résultats sont présentés en nombre de parasites /mm^3.

2. *Mesure de la glycémie*

Elle s'est faite conformément à la procédure prescrite dans le manuel d'utilisation du glycomètre One Touch Ultra No. TSJ8A39RT de LifeScan Inc. qui est fournit par le fabriquant. La procédure était la suivante :

- Placer une bandelette au niveau du glycomètre. Une goutte apparaît sur l'écran de l'appareil.
- Presser la pulpe du doigt du patient pour qu'il y ait un afflux du sang.
- Essuyer la pulpe du doigt avec du coton sec et piquer légèrement avec un vaccinostyle stérile.
- Déposer la goutte de sang sur la bandelette puis essuyer avec du la pulpe du doigt avec du coton imbibé d'alcool. Lire l'absorbance.

D'autre part, nous avons aussi effectué la mesure de la glycémie (pour confirmation des valeurs données par le glucomètre) conformément au mode opératoire utilisé par le service de Biochimie du Laboratoire National de Santé Publique. La procédure était la suivante :

- Prendre un tube à EDTA avec du sang issu du prélèvement, le centrifuger pendant 10 minutes à 1000trs/min.
- Prendre de ce tube 100 µl de plasma puis les introduire dans une cuve. Dans la même cuve y ajouter 1ml (=1000 µl) de réactif de travail constitué d'une solution de déprotéinisation contenant de l'acétate d'uranyle et du chlorure de sodium. Mélanger soigneusement.

- Dans une autre cuve qui sert de blanc, introduire 100 µl d'eau distillée et y ajouter 2 ml de réactif enzymatique contenant du tampon de phosphate, de la 4-aminophénazone, du phénol, du glucose oxydase, de la peroxydase, de la mutarotase et des stabilisants . Mélanger.
- Incuber les cuves à 37°C pendant 5 minutes.
- Mettre ensuite la cuve dans le spectrophotomètre et déclencher le chronomètre. Lire l'absorbance de l'échantillon contre le blanc.

Les valeurs normales de la glycémie sont de 0,72 à 1,1 g/l pour les adultes à jeun.

3. Mesure de la Créatininémie

Elle s'est faite conformément au mode opératoire utilisé par le service de Biochimie du Laboratoire National de Santé Publique. La procédure était la suivante :

- Ramener les réactifs et les cuves à une température de 25°C. Maintenir la température constante pendant toute la durée du test.
- Prendre un tube à sec avec du sang issu du prélèvement, le centrifuger pendant 10 minutes à 1000trs/min.
- Prendre de ce tube 100 µl de sérum puis les introduire dans une cuve. Dans la même cuve y ajouter 1000 µl de réactif de travail contenant du tampon phosphate.
- Dans une autre cuve introduire 100 µl de l'échantillon standard et y ajouter 1000 µl de réactif de travail.
- Mélanger, mettre la cuve dans le spectrophotomètre et déclencher le chronomètre. Après 30 secondes, lire l'absorbance.

Les valeurs normales de la créatininémie sont les suivantes pour les adultes : 7,9-11,3 mg/l soit 70-100 µmol/l.

4. Mesure des transaminases

Elle s'est faite conformément au mode opératoire utilisé par le service de Biochimie du Laboratoire National de Santé Publique. La procédure était la suivante :

- Prendre un tube à sec avec du sang issu du prélèvement, le centrifuger pendant 10 minutes à 1000trs/min.
- Prendre de ce tube 100 µl de sérum puis les introduire dans une cuve.
- Ajouter dans la cuve 1ml de réactif enzymatique contenant du tampon TRIS, de la L-alanine et de la LDH. Mélanger.
- Incuber pendant 5 minutes à 37°C. Ajouter 250 µl de substrat (2-oxoglutarate et NADH), mélanger.
- Mettre la cuve dans le spectrophotomètre et déclencher le chronomètre.

- Après 1 minute, lire l'absorbance.

Les valeurs normales des transaminases (TGO/ASAT et TGP/ALAT) sont de 10 à 40 UI/l pour les adultes.

5. Mesure de l'hémoglobine

Elle s'est faite conformément à la procédure prescrite dans le manuel d'utilisation de l'anémomètre HemoCue Hb 201$^+$ qui est fournit par le fabriquant [50, 51]. La procédure était la suivante :

- Désinfecter la pulpe du doigt du patient avec du coton imbibé d'alcool.
- Piquer légèrement la pulpe du doigt avec du vaccinostyle stérile.
- Essuyer la première goutte de sang avec du coton sec puis déposer la seconde goutte sur la cuvette de l'appareil HemoCue Hb 201$^+$.
- Lire l'absorbance.

Les valeurs normales sont de 14-18 g/dl pour les hommes et de 12-16 g/dl femmes.

6. Enregistrement des effets secondaires

Cette étape s'est faite directement sur une fiche (figure VI) que nous avons établie, comportant les différents effets indésirables listés ainsi que d'autres manifestations adverses que le sujet a pu ressentir.

IV. ***Analyse statistique***

Deux groupes ont été constitués : les sujets naïfs (n=10) et les sujets impaludés (n=6). Les données individuelles sont saisies et analysées à l'aide du logiciel StatView® (SAS Institute Inc.). Les valeurs sont présentées sous formes de moyennes affectées de l'erreur standard sur la moyenne (m ± sem). La comparaison des moyennes caractéristiques de chaque groupe s'est faite grâce au test ***t*** de Student pour échantillons non appariés. Les moyennes des données obtenues au sein du même groupe ont été comparées grâce au test ***t*** de Student pour échantillons appariés.

CHAPITRE III: RESULTATS

I. Données démographiques.

Pour les patients, il était prévu de travailler exclusivement au niveau du lieu de consultation du tradithérapeute. Cependant, les contraintes du calendrier nous ont contraint à ajouter un deuxième site de consultation et de recrutement des patients.

En effet, de septembre à novembre 2006, 43 personnes ont consenties à participer à l'étude au niveau du lieu de consultation du tradithérapeute. Cependant, malgré une description de symptômes laissant apparaître une forme simple du paludisme, les gouttes épaisses réalisées après inclusion dans l'étude se sont toutes avérées négatives. Par conséquent, ces sujets n'étaient plus soumis au protocole et devaient être sortis de l'étude.

Au niveau du CSI de l'Armée du Salut, 7 sujets ont été recrutés avec une parasitémie positive. Les tableaux VII et VIII regroupent les données démographiques correspondant aux sujets ainsi recrutés.

Toutefois, un des sujets s'est plaint de maux de tête nocturnes. Il a dû être exclu à J5, pour poursuivre son traitement avec un antipaludique conventionnel de son choix. Un suivi de plus d'un mois du sujet n'a pas décelé d'effets adverses durables chez ce patient. Un deuxième patient s'est également plaint de légers maux de tête nocturnes de J3 à J5. Il a pu terminer le protocole sans autres manifestations adverses.

Au cours du mois d'Avril 2007, nous avons recruté 10 sujets volontaires à la Faculté des Sciences de Brazzaville. Une goutte épaisse négative et l'absence de signes cliniques apparents, qui trahiraient une quelconque pathologie a permis l'intégration de ces sujets dans l'étude. Ils sont donc dénommés sujets naïfs pour ces motifs. Les tableaux VII et VIII regroupent les données démographiques correspondant aux sujets ainsi recrutés.

Tableau VI: Age et poids des participants à l'étude.

	Age	Poids
Impaludés	43,5 ± 6,07	58,33 ± 2,97
Naïfs	30,1± 3,67	65,9±2,48

Tableau VII: Répartition des participants à l'étude selon le sexe.

	Hommes	Femmes	**Total**
Impaludés	4	2	**6**
Naïfs	6	4	**10**
Total	**10**	**6**	**16**

II. Effets de Trema orientalis au niveau des sujets naïfs et impaludés

1. Effets de Trema orientalis au niveau des sujets naïfs

A J_0, les valeurs des paramètres biologiques des sujets naïfs étaient comprises dans l'intervalle des valeurs normales (Tableau IX). *Trema orientalis* tel qu'administré conformément aux directives du tradithérapeute à tous les sujets naïfs inclus dans l'étude n'a pas provoqué de variations significatives des paramètres biologiques qui ont été mesurés au niveau de ce groupe de sujets (Tableau IX).

Toutefois, 6 sur 10 sujets se sont plaints de légers maux de tête nocturnes pendant 1 à 2 nuits avant J5. Néanmoins, ils ont pu terminer le protocole. 3 sujets ont signalé un effet laxatif bénéfique sur un transit gastro-intestinal réputé lent avant la participation à l'étude.

2. Effets de Trema orientalis au niveau des sujets impaludés

Les valeurs des paramètres biologiques des sujets impaludés étaient comprises entre les normes au moment de l'inclusion (Tableau VIII) à J0.

De J0 à J7, auprès des patients se plaignant de paludisme non compliqué et ayant une parasitémie positive, *Trema orientalis* n'a pas induit des variations statiquement significatives des paramètres biochimiques et biophysiques. Cependant, à J7, aucun parasite n'a été observé (Tableau VIII).

TableauVIII: Effets de Trema orientalis sur les indicateurs biochimiques et biophysiques enregistrés.

Paramètres biologiques	**Sujets impaludés (n= 6)**		Sujets naïfs (n= 10)	
	J_0	**J_7**	J_0	J_7
Densité parasitaire	**783,33 ± 326**	**0**	0	0
Glycémie	**1,02 ± 0,04**	**0,93 ± 0,03**	0,95 ± 0,05	0,9 ± 0,04
Hémoglobine	**13,03 ± 1,08**	**13,85 ± 0,61**	13,19 ± 1,03	13,01 ± 0,90
Créatininémie	**9,25 ±0,69**	**10,76 ± 0,67**	9,06 ± 0,48	7,36 ± 0,74
TGP/ALAT	**12 ± 2,79**	**16,33 ± 1,49**	20,1 ± 4,151	19 ± 5,84
TGO/ASAT	**14,83 ± 2,90**	**19,83 ± 1,47**	23 ± 4,39	22 ± 6,12
Tension artérielle systolique	**11,33 ± 0,76**	**12,66 ± 0,49**	11,2 ± 0,33	11 ± 0,41
Tension artérielle diastolique	**8,33 ± 0,66**	**9,00 ± 0,25**	8,1 ± 0,18	7,88 ± 0,20
Température axillaire	**36,5 ± 0,2**	**36,7 ± 0,2**	36,6 ± 0,2	36,6 ± 0,2

3. Screening phytochimique de Trema orientalis

L'application aux feuilles de *Trema orientalis* des protocoles de révélations a permis de montrer la présence de saponosides, tanins et flavonoïdes mais n'a pas permis de révéler la présence des quinones, des terpènes, des terpènoïdes et des alcaloïdes dans nos conditions expérimentales (Tableau IX).

Tableau IX: Résultat du screening phytochimique des feuilles de Trema orientalis.

Familles chimiques	Saponosides	Tanins	Flavonoïdes	Quinones	Terpènes et Terpènoïdes	Alcaloïdes
	+	+ +	+	-	-	-

+ Présence

- Absence

CHAPITRE IV: DISCUSSION

Le présent mémoire fait partie intégrante d'un programme de recherche doctoral dont les objectifs sont les suivants :

1. Contribuer au développement d'une démarche scientifique, de collaboration avec les tradithérapeutes, pour la mise en place d'une base de données consignant les effets curatifs, thérapeutiques et/ou toxiques des plantes médicinales réputées antipaludiques.
2. Evaluer l'action antipaludique de *Trema orientalis.*
3. Etudier les effets de *Trema orientalis* in vitro sur les cultures de plasmodium falciparum.
4. Etudier les effets de *Trema orientalis* sur la réactivité des plaquettes isolées.

Les deux premiers objectifs ont pu être abordés au cours de cette phase de DEA (Diplôme d'Etudes Approfondies).

Le travail avec le tradithérapeute s'est déroulé dans un bon esprit de collaboration malgré l'absence de cadre juridique pouvant servir de fondation pour cette coopération.

En effet, un cadre juridique faciliterait encore le travail avec les tradithérapeutes quand on sait que ceux-ci se basent souvent sur des présomptions et croyances pour établir un diagnostic. De plus il est souvent arrivé qu'un tradithérapeute ait des réticences à révéler sa recette ou même la plante qu'il utilise pour sa recette. Toutes ces entraves contribuent à accentuer le scepticisme que certains scientifiques ont à l'égard des tradithérapeutes.

Dans notre cas, considérant que la plante était clairement identifiée dès le départ et que nous avons mis en confiance le tradithérapeute, la coopération a été plus aisée. Ce travail montre qu'il est possible de développer une démarche de coopération avec les tradithérapeutes sur un projet scientifique. Cependant les aspects juridiques et techniques doivent être pris en compte.

De nombreux travaux ont été réalisés au Congo sous forme d'enquêtes ethnobotaniques et ont suggéré l'existence d'une multitude de plantes médicinales antipaludiques. Ces constats ainsi réalisés contrastent douloureusement avec la faiblesse de couverture thérapeutique du paludisme au niveau des populations congolaises. Toutefois, des enquêtes ethnobotaniques enregistrent les prétentions de tradithérapeutes et consignent les noms scientifiques et vernaculaires des plantes utilisées. Il reste donc à valider les actions antipaludiques de ces plantes. Afin de répondre rapidement aux besoins thérapeutiques des congolais, la démarche de validation s'est appuyée sur la prise en charge du paludisme par un tradithérapeute.

Après 43 patients se plaignant de paludisme simple auprès du tradithérapeute, il a été constaté que le diagnostique présomptif des patients et du tradithérapeute était souvent faux. En effet, tous ces sujets avaient une parasitémie négative. Ce résultat n'est pas surprenant si l'on considère qu'au Congo

de nombreuses maladies infectieuses et métaboliques peuvent se manifester par des « accès fébriles » évocateurs d'un paludisme simple. Le recrutement de patients au niveau d'autres sites a permis de constituer deux groupes à savoir des sujets naïfs et des sujets impaludés.

Le groupe des sujets naïfs a permis de vérifier que les décoctions de *Trema orientalis* telles qu'administrées traditionnellement n'évoquent pas des variations significatives de la température axillaire, de la tension artérielle, de l'hémoglobine, de la transaminasémie, de la créatininémie et de la glycémie. Il est donc permis de penser qu'au niveau de sujets apparemment en bonne santé, et au cours de la durée préconisée du traitement *Trema orientalis* n'a pas d'effet soit sur la masse pondérale, sur la régulation de la température corporelle, sur l'hématocrite, sur la glycémie, sur la régulation de la tension artérielle, sur la fonction hépatique, ni sur la fonction rénale. Ces résultats importants sont rassurants mais devront être confirmés au moment des essais cliniques de grande envergure qu'il faudra entreprendre ultérieurement. En dehors de ces paramètres qui n'ont pas été affectés, il importe de signaler qu'une grande proportion de sujets naïfs s'est plainte de maux de tête. L'action neurotrope de *Trema orientalis* a été suggérée par ses effets anticonvulsifs et antiépileptiques présumés [10, 43]. Des expérimentations sur modèle animal suggèrent également des effets neurotropes [44]. Cependant, dans nos conditions d'étude, il n'est pas permis de spéculer sur les mécanismes intimes de ces maux de têtes qui pourraient être d'origine vasculaire, neurologique ou métabolique.

Un groupe de sujets impaludés a été constitué. Il a fallu recruter 50 patients au total dont 43 ont été exclus parce qu'ayant une parasitémie négative et un qui a été exclut pour cause d'effets secondaires. Au niveau des 6 sujets retenus, *Trema orientalis* telle qu'administré traditionnellement a permis d'éradiquer la parasitémie au niveau de tous les sujets impaludés. Ce résultat valide donc les présomptions des tradithérapeutes Congolais que *Trema orientali*s est une plante antipaludique. Cependant, l'induction de maux de tête par la formulation traditionnelle mérite de poursuivre ces études en vue d'améliorer l'utilisation de cette plante comme phytomédicament.

Le travail s'est poursuivi avec une identification des familles chimiques présentes au niveau des feuilles de *Trema orientalis* qui sont la partie utilisée traditionnellement. L'étude phytochimique a révélé la présence de tanins, de saponosides et de flavonoïdes. Toutefois nos analyses ne nous ont pas permis de révéler la présence de quinones, d'alcaloïdes, de terpènes et terpènoïdes. Au niveau de notre université un travail précédent avait pu révéler la présence d'alcaloïdes dans les feuilles de *Trema orientalis* [42]. Malgré nos efforts pour réaliser le même protocole, nous n'avons pas pu révéler la présence d'alcaloïdes dans nos conditions expérimentales.

Notons que l'action antipaludique de *Trema orientalis* peut être due soit à l'action de l'une de ces familles chimiques soit à leur action synergique. L'action de *Trema orientalis* peut varier en fonction de la concentration de la partie utilisée. L'action synergique de substances pharmaco actives à l'état de traces peut se révéler pertinente à l'action thérapeutique des feuilles de *Trema orientalis*, y compris dans les conditions où l'analyse phytochimique n'a pas pu révéler telle ou telle famille chimique. Il

serrait donc intéressant pour les études in vitro de procéder à des extractions chimiques des substances contenues dans les différentes parties utilisées traditionnellement (feuilles, écorces, tiges, pulpe de fruits, racines) à travers l'Afrique. Cette démarche permettra de révéler quelles sont les familles chimiques qui sont parasiticides ou agissent en synergie dans l'action antipaludique de *Trema orientalis.*

L'utilisation des plantes médicinales pour le traitement du paludisme a été validée au sein de notre université par une approche *in vivo* pour *Tetracera alnifolia* (Dilleniaceae), *Cassia siamea* (Cesalpiniaceae) et *Cassia spectabilis* (Cesalpiniaceae) [8]. Une approche *in vitro* a démontré les effets parasiticides des flavonoïdes, hétérosides cardiotoniques et alcaloïdes de *Cassia spectabilis* (Cesalpiniaceae). Cependant les effets de ces familles chimiques considérés individuellement n'ont pas été investigués [36].

Euphorbia hirta L. (Euphorbiaceae) est une plante antipaludique dont l'action parasiticide se retrouve au niveau de diverses familles chimiques considérées individuellement (saponines, tanins, flavonoïdes et anthocyanidines, respectivement). Ainsi il a été démontré qu'il existe autant de principes actifs parasiticides que de familles chimiques au sein d'*Euphorbia hirta* L.

Cassia occidentalis, Garcinia cola et *morinda morindoïdes* possèdent également la particularité de combiner plusieurs substances parasiticides [52]. Au niveau des prochaines étapes de l'étude de *Trema orientalis*, l'extraction des différentes familles chimiques nous permettra de vérifier si cette plante combine les substances parasiticides ou synergiques appartenant à diverses familles chimiques.

CHAPITRE V: CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail de DEA avait pour objectif de :

1. Contribuer au développement d'une démarche scientifique, de collaboration avec les tradithérapeutes, pour la mise en place d'une base de données consignant les effets curatifs, thérapeutiques et/ou toxiques des plantes médicinales réputées antipaludiques
2. Evaluer l'action antipaludique de *Trema orientalis.*

En ce qui concerne le travail avec les tradithérapeutes, la mise en place d'un cadre juridique faciliterait la coopération. En effet, l'absence de cadre juridique de cette coopération a fait naître des contradictions et des suspicions nuisibles à l'avancement des travaux de recherche. Considérant que la plante était clairement identifiée dès le départ, il est aisé d'imaginer les complications inhérentes à la collaboration portant sur une recette composée de plusieurs plantes. Des efforts doivent être faits pour débroussailler ces aspects juridiques. Le diagnostique présomptif et l'empirisme qui caractérisent la démarche des tradithérapeutes ouvre la porte au scepticisme quant à l'efficacité des plantes médicinales traditionnelles. Dans le cadre du présent travail, nous avons accueilli 43 patients présentant les symptômes du paludisme mais ayant une parasitémie négative. Ces données démontrent que la coopération avec les tradithérapeutes devra s'accompagner d'un renforcement des capacités qui évitera les mauvais diagnostics pour des pathologies aussi communes.

Ce travail a montré que *Trema orientalis* administré selon la forme traditionnelle est capable de traiter les formes simples du paludisme. Dans le contexte de notre travail, il n'est pas établi si oui ou non Trema orientalis est parasiticide. De même, il n'est pas possible d'affirmer que *Trema orientalis* est capable d'induire des effets physiologiques favorables à l'éradication du parasite. Toutefois, la prise en charge de formes compliquées du paludisme avec *Trema orientalis* reste à démontrer.

En prélude à cet essai clinique, des investigations portant sur l'action des différents extraits de *Trema orientalis* pris individuellement ou en combinaison permettront de déterminer si ces extraits bloquent le cycle érythrocytaire de *Plasmodium falciparum* ou s'ils agissent sur les cellules humaines (plaquettes, cellules endothéliales, monocytes) pour inhiber l'action délétère des toxines malariques et/ou des cytokines inflammatoires. De même une étude sera effectuée sur les effets de *Trema guineensis* sur culture parasitaire synchronisée, sur le métabolisme du calcium parasitaire, sur les cellules humaines et sur l'activation de l'agrégation plaquettaire.

BIBLIOGRAPHIE

1. Ministère de la Santé et de la Population. (2007). “**Programme National de Développement Sanitaire (PNDS) 2006-2010**”.

2. Gouvernement de la République du Congo, Système des Nations Unies. (2004). “**Rapport national sur les objectifs du millénaire pour le développemen**t”.

3. Ministère de la Santé et de la Population. (2003) “**Profil pays pour environnement sain pour les enfants**”.

4. Yang Z, Zhang Z, Sun X, Wan W, Cui L, Zhang X, Zhong D, Yan G, Cui L. (2007) “**Molecular analysis of chloroquine resistance in Plasmodium falciparum in Yunnan Province, China**”. Trop Med Int Health **12**(9):1051-60.

5. Wéry M, Coosemans M. (1993). “**Les coûts du Paludisme et son impact socio-économique en Afrique**” Cahiers santé **3**: 323-30.

6. Snow R et al. (1999). “**Estimating mortality, morbidity and disability due to malaria among Africa's non-pregnant population.**” *Bulletin of the World Health Organization* **77**(8): 624-40.

7. Roll Back Malaria, World Health Organisation and UNICEF. (2005) “**World Malaria Report 2005**“. P 24

8. Nsonde-Ntandou G F, Ndounga M, Ouamba J-M, Gbeassor M, Etou-Ossebi A, Ntoumi F, Abena A A (2005). “**Enquête ethnobotanique:screening chimique et efficacité thérapeutique de quelques plantes utilisées contre le Paludisme en médecine traditionnelle à Brazzaville**” Phytothérapie **1** : 13-18.

9. Bouquet A. (1969) “**Féticheurs et médecines traditionnelles du Congo (Brazzaville)**”. Mémoires ORSTOM. Paris. (36) p 238.

10. Kabangu K. (1990). “**Eléments de phytothérapie comparée, plantes médicinales Africaines**“. Centre de Recherches Pédagogiques de Kinshasa. Kinshasa. p 82.

11. Phillips R S. (2001). “**Current Status of Malaria and Potential for Control**” Clin Microbiol Rev. **14**(1):208-26

12. Schrével J. (1994). “**Les cibles hépatiques et érythrocytaires du Plasmodium au cours du paludisme**” Regard sur la Biochimie. (1): 13-23.

13. Bischoff E. (2006).http: // ebischoff.free.fr/Palu/Palu.html.

14. Trampuz A, Jereb M, Muzlovic I and Prabhu R M. (2003) “**Clinical review: Severe malaria**” Critical Care **7(4)**:315-323

15. Chen Q, Schlict M and Wahjgren M. (2000). “**Molecular Aspects of Severe Malaria**” Clinical Microbiology review **13**(3): 439-450.

16. Wickham M E, Rug M, Stuart A R, Klonis N, McFadden G I, Tilley L and Cowman A F. (2001). “**Trafficking and assembly of the cytoadherence complex in Plasmodium falciparum-**

infected human erythrocytes." The EMBO Journal. **20**(20): 5636-5649.

17. Clark I A, Alleva L M, Mills Alison C and Cowden William B. (2004). "**Pathogenesis of malaria and clinically similar conditions**" Clinical Microbiology Reviews. **17**(3): 509-539.

18. Hommel M. (1996). "**Physiopathologie des symptômes du Paludisme rôle des cytokines, de la cytoadhérence et de la prémunition**" Presse Médicale. **25**(2): 70-76.

19. Parroche P, Lauw F N, Goutagny N, Latz E, Monks B G, Visintin A, Halmen K A, Lamphier M, Olivier M, Bartholomeu D C, Gazzinelli R T, Golenbock D T. (2007). "**Malaria hemozin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9**" PNAS. **104**(6): 1919-1924.

20. Keller C C, Kremsner P G, Hittner J B, Misukonis M A, Weinberg J B, Perkins G J. (2004). "**Elevated Nitric Oxide Production in Children with Malarial Anemia: Hemozoin-Induced Nitric Oxide Snthase Type 2 Transcripts and Nitric Oxide in Blood Mononuclear Cells**" Infection and Immunity. **72**(8): 4868-4873.

21. Moore J M, Chaisavaneeyakorn S, Perkins D J, Othoro C, Otieno J, Nahlen B L, Ping Shi Y, Udhayakumar V. (2004). "**Hemozoin Differentially Regulates Proinflammatory Cytokine Production in Human Immunodeficiency Virus-Seropositive and -Seronegative Women with Placental Malaria**" Infection and Immunity. **72**(12): 7022-7029.

22. Luty A J F, Perkins D J, Lell B, Schmidt-Ott R, Lehman L G, Luckner D, Greve B, Matousek P, Herbich K, Schmid D, Weinberg J. B, Kremsner P G. (2000). "**Low Interleukin-12 Activity in Severe *Plasmodium falciparum* Malaria**" Infection and Immunity. **68** (7): 3909–3915.

23. Schwarzer E, Alessio M, Ulliers D, Arese P. (1998). "**Phagocytosis of the Malarial Pigment, Hemozoin, Impairs Expression of Major Histocompatibility Complex Class II Antigen, CD54, and CD11c in Human Monocytes**" Infection and Immunity. **66** (4): 1601–1606.

24. Gilson P R, Nebl T, Vukcevic D, Moritz R L, Sargeant T, Speed T P, Schofield L, Crabb B S. (2006). "**Identification and Stoichiometry of Glycosylphosphatidylinositol-anchored Membrane Proteins of the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum***" Molecular & Cellular Proteomics **5** (7): 1286–1299.

25. Naik R S, Davidson E A, Gowda D C. (2000). "**Developmental Stage-specific Biosynthesis of Glycosylphosphatidylinositol Anchors in Intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* and Its Inhibition in a Novel Manner by Mannosamine**" **275** (32): 24506–24511.

26. Sütterlin C, Horvath A, Gerold P, Schwarz R T., Wang Y, Dreyfuss M, Riezman H (1997) "**Identification of a species-specific inhibitor of glycosylphosphatidylinositol synthesis**" The EMBO Journal **16**(21): 6374–6383

27. Krishnegowda G, Hajjar A M, Zhu J, Douglass E J, Uematsu S, Akira S, Woods A S, Channe Gowda D. (2005). "**Induction of proinflammatory responses in macrophages by the Glycosylphosphatidylinositols of *plasmodium falciparum.* Cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity**" The Journal of Biological Chemistry **280** (9): 8606–8616.

28. Movahedi S, Hooper N M. "**Insulin stimulates the release of the glycosyl phosphatidylinositol-anchored membrane dipeptidase from 3T3-L1 adipocytes through the action of a phospholipase C**" Biochem. J. (1997) **326**, 531-537.

29. Maeda Y, Tashima Y, Houjou T, Fujita M, Yoko-O T, Jigami Y, Taguchi R, Kinoshita T. (2007). "**Fatty Acid Remodeling of GPI-anchored Proteins Is Required for Their Raft Association**" Molecular Biology of the Cell **18**: 1497–1506

30. Debierre-Grockiego F, Schofield L, Nahid Azzouz, Schmidt J, Santos de Macedo C, Ferguson M A J, Schwarz R T.(2006). "**Fatty Acids from *Plasmodium falciparum* Down-Regulate the Toxic Activity of Malaria Glycosylphosphatidylinositols**" Infection and Immunity **74**(10): 5487–5496.

31. Marfurt J, Müeller I, Sie A, Maku P, Goroti M, Reeder JC, Beck HP, Genton B. (2007). "**Low Efficacy of Amodiaquine or Chloroquine Plus Sulfadoxine-Pyrimethamine against Plasmodium falciparum and P. vivax Malaria in Papua New Guinea**". Am J Trop Med Hyg.77(5):947-54.

32. Eckstein-Ludwig U, Webb RJ, Van Goethem ID, East JM, Lee AG, Kimura M, O'Neill PM, Bray PG, Ward SA, Krishna S. (2003) "**Artemisinins target the SERCA of Plasmodium falciparum**". Nature **424**(6951):957-61

33. Hoppe H C, Schalkwyk, D. A. Van, Wiehart U I M, Meredith S A, Egan J, Weber B W (2004). "**Antimalarial quinolines and artemisinin inhibit endocytosis in plasmodium falciparum**" Antimicrobial Agents and Chemotherapy **48**(7): 2370-2378.

34. Taylor W R J, White N J. (2004). "**Antimalarial drug toxicity: a review**" Drug Safety **27**(1): 25-61.

35. OMS (2005) " **Mise à l'échelle nationale de la prise en charge à domicile du paludisme**".

36. Casimiro P. (2006). "**Etudes in vitro de la variabilité de l'activité antipaludique de *Cassia spectabilis* D. C. enfonction des organes et des saisons**". Mémoire de DEA, Brazzaville.

37. Letouzey R. (1968). "**Flore du Cameroun. Spermaphytes. Ulmaceae**". Muséum National d'histoire naturelle, Paris 5è. Pp 48-55.

38. Hawthorne W and Jongkind C. (2006). "**Woody plants of western African forest: ulmaceae**". Royal Botanic Gardens, kew. Pp 262-263.

39. Anon. (1986). "**The useful plants of India"**. Publications & Information Directorate, CSIR, New Delhi, India.

40. Noad T, Birnie A. (1989). "**Trees of Kenya"**. General Printers, Nairobi.

41. Perry LM. (1980). "**Medicinal plants of East and South East Asia**: **attributed properties and uses**". MIT Press. South East Asia.

42. Etou Ossibi A W (2004). "**Evaluation des effets cardiaques de trois plantes médicinales congolaises : *Boerhaavia diffusa* Linn, *Trema guineensis* Schum. & Thonn, *Lippia multiflora* Moldenke, sur le caoeur de Crapaud**".Mémoire de DEA, Brazzaville.

43. Larousse Afrique. (1983) " **Encyclopédie médicinale de l'Afrique, 6ème partie**"**.** p1083. Paris.

44. N'Gouemo P, Pambou-Tchivounda H, Baldy-Moulinier M, Koudogbo B, N'Guemby-Bina C. (1994). "**Some pharmacological effects of an ethanolic extract of Trema guineensis on the central nervous system in rodents**". Planta Med. **60**(4):305-7.

45. Dohou N. (2003). “**Screening phytochimique d’une endémique Ibéro-marocaine, *Thymelea lythroïdes***”. Bull. Soc. Pharm. 142: 61-78.

46. Jaiyeoba A, E. O. (2000). “**Phytochemical and antimicrobial studies of *Gynandropsis gynandria* and *Buchmolzia coriaceae* extracts**”. African Journal of Biomedical Research. **3**(3): 161-165.

47. Rizk A M. (1982). ”**Constituents of plants growing in Qatar**”. Fitoterapia. **52**(2): 35-42.

48. Bouquet A. (1975). ”**Plantes médicinales du Congo-Brazzaville ewariopsis, Pauridiantha, Diospyros**” Travaux et documents de l’ORSTOM. ORSTOM. Paris. **13**: 8-10

49. Lagnika L. (2005). ”**Etude Phytochimique Et Activite Biologique De Substances Naturelles Isolees De Plantes Beninoises**”. Thèse de Doctorat. Strasbourg. Pp. 113-115

50. Back S-E et al. (2004). “**Multiple-Site Analytic Evaluation of a New Portable Analyzer, HemoCue Hb 201+, for Point-of-Care Testing**”. Point of Care **3**(2): 60-65

51. Vanzetti G. (1966). “**An azidemethemoglobin method for hemoglobin determination in blood**”. J. Lab. Clin. Med. 67, 116-26.

52. Tona L, Cimanga R, Mesia K, Musuamba CT, De Bruyne T, Apers S, Hernans N, Van Miert S, Pieters L, Totte J, Vlietinck AJ. (2004). “**In vitro antiplasmodial activity of extracts and fractions from seven medicinal plants used in the Democratic Republic of Congo**” J Ethnopharmacol. **93**(1): 27-32.

53. Sherman I W. (1998). “**Malaria. Parasite Biology, Pathogenesis and Protection**” J Ethnopharmacol. 303-368.

ANNEXE

No. 06/01.10.2006

QUESTIONNAIRE

Noms……[redacted]……………………
Prénoms……[redacted]……………………
Adresse……Avenue de la base……………………
Tel……………………
Profession……Maçon……………………
Age……44 ans……………………
Sexe M ☒ F ☐

1. Que ressentez vous?

Fièvre ☒ Courbatures ☒ Maux de tête ☒ Vomissements ☐ Nausées ☐
Diarrhée ☐ Vertiges ☐ Maux de ventres ☐ Insomnies ☐
Autres ☐ ……………………
……………………

2. Avez vous vu un médecin ?

Oui ☐ Non ☒

3. Souffrez vous souvent du Paludisme ?

Oui ☒ Non ☐

4. Vous étés vous déjà soigne avec une tisane ?

Oui ☐ Non ☒
Si oui laquelle ……………………

5. Quelle était la posologie ?

R……………………
……………………

6. A t elle été efficace ?

Oui ☐ Non ☐

Consentez-vous à faire partie de l'étude ?
Oui ☒ Non ☐

Figure 6: Questionnaire. Les informations et les symptômes ressentis par les patients se plaignant d'accès palustres y sont notés. A la fin de l'interrogatoire, le patient décide de son consentement ou non à participer à l'étude.

RESUME

En république du Congo, plus de la moitié des motifs de consultation en milieu hospitalier concernent le Paludisme. Il s'agit donc d'un problème de santé publique majeur. Cependant, avec l'apparition de souches de *Plasmodium falciparum* résistantes aux spécialités pharmaceutiques disponibles sur le marché congolais, le coût du traitement du Paludisme devient inaccessible pour la majorité des congolais. Ainsi, ce travail avait pour objectif de développer un protocole de validation scientifique des plantes médicinales antipaludiques telles qu'administrées par les tradithérapeutes. Les feuilles de *Trema orientalis* sont utilisées pour le traitement du Paludisme par les tradithérapeutes congolais. Le deuxième objectif de ce travail était donc de valider l'action antipaludique de *Trema orientalis* et de vérifier qu'il n'exerce pas d'effets secondaires graves. L'étude s'est déroulée à Brazzaville. Des patients étaient recrutés chez le tradithérapeute et au niveau d'un centre de soins intégrés conventionnel. Les paramètres suivants ont été enregistrés auprès de tous les sujets recrutés : poids, âge, sexe, parasitémie, température corporelle, glycémie, taux d'hémoglobine, créatininémie, transaminases et tension artérielle. Une décoction des feuilles de *Trema orientalis* préparée par le tradithérapeute (200 grammes dans 5 litres portés à ébullition pendant 45 minutes) est administrée aux sujets impaludés et aux volontaires à la dose d'1/4 de verre bambou (40 ml) *per os* matin midi et soir pendant 7 jours. Des prélèvements sanguins sont effectués à J0 et J7. Les résultats sont analysés statistiquement à l'aide du test *t* de Student pour échantillons non appariés. Au niveau des sujets volontaires, ayant une goutte épaisse négative, *Trema orientalis* n'a pas évoqué d'effets significatifs sur la température corporelle, la glycémie, le taux d'hémoglobine, la créatininémie, les transaminases et la tension artérielle. Cependant, 3 sur 10 sujets volontaires se sont plaints de maux de tête. Au niveau des sujets impaludés, *Trema orientalis* n'a pas évoqué d'effets significatifs sur la température corporelle, la glycémie, le taux d'hémoglobine, la créatininémie, les transaminases et la tension artérielle. Cependant, l'administration de *Trema orientalis* a abouti à l'éradication de la parasitémie à J7. Le screening phytochimique des feuilles de *Trema orientalis* a permis de révéler la présence de saponosides, tanins, flavonoïdes et l'absence de terpènes, terpènoïdes, quinones libres et d'alcaloïdes. Les enquêtes ethnobotaniques réalisées au Congo démontrent une connaissance de *Trema orientalis* par la grande majorité des ethnies du Congo. Ainsi, le tradithérapeute avait mis en garde l'équipe scientifique sur la possibilité de maux de tête en cas de traitement du Paludisme avec *Trema orientalis* seul. L'adoption définitive de ce mode de traitement du Paludisme devra surmonter cet handicap. La démonstration de l'action antipaludique de *Trema orientalis* suggère qu'il est possible sur la base de cette plante de développer un phytomédicament antipaludique accessible sur tout le territoire congolais à coût très modique. Il est donc important de poursuivre cette étude afin de déterminer l'efficacité thérapeutique de *Trema orientalis* et d'améliorer les conditions de son administration.

Mots clés : *Trema guineensis*, parasitémie, glycémie, hémoglobine, tension artérielle, saponosides, tanins, flavonoïdes.